



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Maria das Graças Coelho de Souza


Relação entre biomarcadores inflamatórios, de adesão celular, de estresse oxidativo, de lesão endotelial, remodelamento tecidual e vascular e os diferentes estágios da doença venosa crônica primária (classes clínicas CEAP C_{0a}, C₂, C₃, C₄)

Rio de Janeiro

2013

Maria das Graças Coelho de Souza

Relação entre biomarcadores inflamatórios, de adesão celular, de estresse oxidativo, de lesão endotelial, remodelamento tecidual e vascular e os diferentes estágios da doença venosa crônica primária (classes clínicas CEAP C_{0a}, C₂, C₃, C₄)



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora Prof.^a Dra. Eliete Bouskela

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S729 Souza, Maria das Graças Coelho de.

Relação entre biomarcadores inflamatórios, de adesão celular, de estresse oxidativo, de lesão endotelial, remodelamento tecidual e vascular e os diferentes estágios da doença venosa crônica primária (classes clínicas CEAP C_{0a}, C₂, C₃, C₄) / Maria das Graças Coelho de Souza. – 2013.

136 f. : Il.

Orientadora: Eliete Bouskela.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Varizes – Teses. 2. Células endoteliais – Teses. 3. Doenças vasculares – Teses. I. Bouskela, Eliete. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.14-007.64

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Maria das Graças Coelho de Souza

Relação entre biomarcadores inflamatórios, de adesão celular, de estresse oxidativo, de lesão endotelial, remodelamento tecidual e vascular e os diferentes estágios da doença venosa crônica primária (classes clínicas CEAP C_{0a}, C₂, C₃, C₄)

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 20 de agosto de 2013.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Eliete Bouskela (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Francisco Humberto de Abreu Maffei

Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Marília Duarte Brandão Panico

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

À todos que me querem bem.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo à Deus por me ajudar a superar as dificuldades, guiando a minha trajetória até aqui.

Aos meus pais e irmãos por serem tudo para mim e pelo amor incondicional.

À Prof.^a Dra. Eliete Bouskela pela orientação científica, pelo exemplo de liderança, determinação e profissionalismo, por todos os ensinamentos e por toda confiança depositada em mim. A minha eterna gratidão.

À minha tia Ione pelo carinho e incentivo ao meu trabalho.

À Camila Veiga Louzada, Flavia Maria da Silva Veiga de Sousa, Monique Pacheco Duarte Carneiro e Yasmine Rangel Vieira pela preciosa e imprescindível ajuda na realização das análises dos biomarcadores.

À toda equipe médica do estudo: Dr. Carlos Eduardo Virgini Magalhães, Dr. Bernardo Barros, Dra. Mônica Mayall, Dr. Felipe Borges Fagundes, Dra. Helen Pessoni e Dr. Roberto Nishio pelo atendimento clínico às participantes do estudo e à Dra. Carmen Lascasas Porto pela realização dos exames de Eco-Doppler em todas as participantes.

À Michelle Morata de Andrade responsável pela coordenação do estudo.

À Gloria Nunes da Silva pelo valoroso auxílio à coordenação do estudo, pelo carinho e atenção com todas as participantes do estudo e com todos os membros da equipe.

À Eliza Ávila pela sua incansável disposição em ajudar.

Ao Diogo Silva Francisco pela coleta de sangue de todas as participantes.

Aos membros da banca examinadora por terem se disposto a avaliar esse trabalho.

À Amélia Gomes, secretária do Programa Pós-graduação, pela boa vontade em me ajudar, sempre.

Às queridas amigas Priscila Alves Maranhão e Ingrid Bárbara Dias pelo apoio, carinho pelas conversas e risadas que amenizaram, e muito, a minha caminhada até aqui.

À Flavia Maria da Silva Veiga de Sousa pela amizade e pelo suporte técnico dado ao pessoal do laboratório que permitiu que eu me ausentasse para redigir a tese com a tranquilidade necessária.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vascular ao longo desses 18 anos pelo carinho e por torcerem por mim.

A ciência será sempre uma busca, jamais um descobrimento real. É uma viagem nunca uma chegada.

Karl Popper

RESUMO

SOUZA, Maria das Graças Coelho de. **Relação entre biomarcadores inflamatórios, de adesão celular, de estresse oxidativo, de lesão endotelial, remodelamento tecidual e vascular e os diferentes estágios da doença venosa crônica primária (classes clínicas CEAP C_{0a}, C₂, C₃, C₄).** 2013. 136 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2013.

A doença venosa crônica (DVC) é uma desordem complexa que compreende sinais e sintomas que variam das telangiectasias às úlceras ativas. A DVC é classificada de acordo com aspectos clínicos, etiológicos, anatômicos e fisiopatológicos (CEAP) em sete classes variando de C₀ à C₆. A principal causa da DVC é a hipertensão venosa que altera o fluxo venoso e, conseqüentemente, a força de cisalhamento que induz alterações fenotípicas nas células endoteliais que passam a expressar mediadores pró-inflamatórios e pró-trombóticos, que levam à adesão de leucócitos, ao aumento do estresse oxidativo, da permeabilidade vascular e do dano endotelial e ao remodelamento tecidual e vascular. Em virtude dos inúmeros mecanismos e da diversidade de moléculas envolvidas na patogênese e progressão da DVC, é essencial conhecer a interação entre elas e também saber quais são as moléculas (biomarcadores) que se correlacionam positivamente ou negativamente com a gravidade da doença. Foram avaliados os níveis de Interleucina-6 (IL-6), sL-selectina, sE-selectina, sP-selectina, molécula de adesão intercelular-1solúvel (sICAM-1), molécula de adesão das células vasculares-1 solúvel (sVCAM-1), ativador tecidual do plasminogênio (tPA), atividade do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), trombosmodulina solúvel (sTM), fator de von Willebrand (vWF), metaloproteinase de matriz (MMP)-2, MMP-3, MMP-9, inibidor tecidual das MMPs -1 (TIMP-1), angiopoietina-1 e -2, sTie-2 e s-Endoglina e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) no sangue coletado da veia braquial de 173 mulheres com DVC primária divididas em grupos C₂, C₃, C₄ e C₄ menopausadas (C_{4m}) e de 18 voluntárias saudáveis (grupo C_{0a}). Foram também analisados os níveis urinários de *ent*-prostaglandina F_{2α} nesses grupos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas com relação às concentrações sanguíneas e urinárias de sE-selectina, sP-selectina, sICAM-1, atividade de PAI-1, MMP-3, razão TIMP-1/MMP-3, angiopoietin-2, razão angiopoietina-1/angiopoietina-2, s-Endoglina e *ent*-prostaglandina F_{2α} entre os grupos estudados, possivelmente devido à alta variabilidade na concentração desses biomarcadores entre as participantes do mesmo grupo. Entretanto, as concentrações sanguíneas de IL-6 sL-selectina, sVCAM-1, tPA, vWF, sTM, MMP2, MMP-9, TIMP-1, razão TIMP-1/MMP-2, razão TIMP-1/MMP-9, angiopoietina-1 e VEGF foram estatisticamente diferentes entre os grupos. Não foi identificado nenhum biomarcador que se correlacionasse diretamente ou inversamente com a progressão da DVC, provavelmente devido à diversidade de fatores envolvidos e à complexa interação entre eles durante o curso da doença.

Palavras-chave: Veias varicosas. Inflamação. Lesão endotelial. Remodelamento tecidual.

Remodelamento vascular.

ABSTRACT

SOUZA, Maria das Graças Coelho de. **Relationship between biomarkers of inflammation, cell adhesion, oxidative stress, endothelial cell damage, vascular and tissue remodeling and the different stages of primary chronic venous disease (CEAP clinical classes C_{0a}, C₂, C₃, C₄).** 2013. 136 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2013.

Chronic Venous Disease (CVD) is a complex disorder, which encompasses signs and symptoms that vary from telangiectasias to active ulcers. The CVD is classified according Clinical, Etiologic, Anatomical and Pathophysiological (CEAP) aspects into seven classes varying from C₀ to C₆. The main cause of CVD is venous hypertension, which alters venous flow and consequently, shear stress. Abnormal shear stress induces phenotypic changes in endothelial cells that start to express pro-inflammatory and pro-thrombotic mediators that lead to leukocyte adhesion, oxidative stress, increased vascular permeability and endothelial cell damage and tissue and vascular remodeling. Due to several mechanisms and the diversity of molecules involved in the pathogenesis and progression of CVD, is essential to know the interplay between them and which are the molecules (biomarkers) that correlate positively and negatively with the severity of the disease. We investigated the levels of interleukin-6 (IL-6), sL-selectin, sE-selectin, sP-selectin, soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1), tissue plasminogen activator (tPA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) activity, soluble thrombomodulin (sTM), von Willebrand factor (vWf), matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-3, MMP-9, tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1), angiopoietin-1 and -2, sTie-2, s-Endoglin, vascular endothelial growth factor (VEGF) in the blood taken from the brachial vein of 173 patients with primary CVD divided into C₂, C₃, C₄ and menopausal C₄ (C_{4m}) groups and 18 healthy volunteers (C_{0a} group). We also investigated the urinary levels of *ent*-prostaglandin F_{2α} in these groups. There was no statistically significant difference between groups with respect to blood or urinary levels of sE-selectin, sP-selectin, sICAM-1, PAI-1 activity, MMP-3, TIMP-1/MMP-3 ratio, angiopoietin-2, angiopoietin-1/angiopoietin-2 ratio, s-Endoglin and *ent*-prostaglandin F_{2α}, likely due to the high variability of these biomarkers concentration among participants within the same group. However, blood levels of IL-6, sL-selectin, sVCAM-1, tPA, vWF, sTM, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-1/MMP-2 ratio, TIMP-1/MMP-9 ratio, angiopoietin-1 and VEGF were statistically different between groups. It was not identified any biomarker that correlated directly or inversely with the progression of CVD, probably due to the diversity of factors involved and the complex interplay between them in the course of the disease.

Keywords: Varicose veins. Inflammation. Endothelial cell damage. Tissue remodeling. Vascular remodeling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1–	A Classificação CEAP.....	16
Quadro 2–	Nome dos 18 segmentos venosos (com designação numérica).....	17
Quadro 3–	Biomarcadores / Método Analítico / Kits / Espécimes / Fator de Diluição / Ajuste da Curva / Armazenagem.....	56
Figura 1 –	Recrutamento das pacientes C ₂ , C ₃ , C ₄ , C _{4m} para o estudo.....	58
Figura 2 –	Recrutamento das voluntárias saudáveis para o estudo.....	59
Gráfico 1 –	Comparação entre as faixas etárias dos grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	60
Gráfico 2 –	Comparação entre as estaturas dos grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	61
Gráfico 3 –	Comparação entre a massa corporal dos grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	62
Gráfico 4 –	Comparação entre os índices de massa corporal dos grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	63
Gráfico 5–	Comparação entre o número de eritrócitos circulantes no sangue periférico das participantes dos grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	64
Gráfico 6 –	Comparação entre o número de leucócitos circulantes no sangue periférico das participantes dos grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	65
Gráfico 7 –	Comparação entre a razão leucócitos/eritrócitos no sangue periférico das participantes C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	66
Gráfico 8 –	Comparação do valor hematócrito entre as participantes dos grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	67
Gráfico 9 –	Comparação do valor de proteína C reativa entre as participantes dos grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	68
Gráfico 10 –	Comparação da concentração sérica de Interleucina-6 entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	69
Gráfico 11 –	Comparação da concentração sérica de sL-selectina entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	70
Gráfico 12 –	Comparação da concentração sérica de sE-selectina entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	71
Gráfico 13 –	Comparação da concentração plasmática de sP-selectina entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	72
Gráfico 14 –	Comparação da concentração sérica de sICAM-1 entre os grupos C _{0a} ,	

	C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	73
Gráfico 15 –	Comparação da concentração sérica de sVCAM-1 entre os grupos grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	74
Gráfico 16 –	Comparação da concentração plasmática de tPA entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	75
Gráfico 17 –	Comparação da atividade plasmática de PAI-1 entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	76
Gráfico 18 –	Comparação da concentração plasmática de fator de von Willebrand entre os grupos grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	77
Gráfico 19 –	Comparação da concentração plasmática de sTrombomodulina entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	78
Gráfico 20 –	Comparação da concentração sérica de MMP-2 entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	79
Gráfico 21–	Comparação da concentração sérica de MMP-3 entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	80
Gráfico 22 –	Comparação da concentração plasmática MMP-9 entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	81
Gráfico 23 –	Comparação Comparação da concentração sérica de TIMP-1 entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	82
Gráfico 24 –	Comparação da razão TIMP-1/MMP-2 entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	83
Gráfico 25 –	Comparação da razão TIMP-1/MMP-3 entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	84
Gráfico 26 –	Comparação da razão TIMP-1/MMP-9 entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	85
Gráfico 27 –	Comparação da concentração plasmática de Angiotensina-1 entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	86
Gráfico 28 –	Comparação da concentração plasmática de Angiotensina-2 entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	87
Gráfico 29 –	Comparação a razão Angiotensina-1/Angiotensina-2 entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	87
Gráfico 30 –	Comparação da concentração plasmática de sTie-2 entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	88

Gráfico 31 –	Comparação da concentração plasmática de VEGF entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	89
Gráfico 32 –	Comparação da concentração sérica de sEndoglina entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	90
Gráfico 33 –	Comparação da concentração urinária de <i>ent</i> -Prostaglandina F _{2α} entre os grupos C _{0a} , C ₂ , C ₃ , C ₄ e C _{4m}	91
Quadro 4 –	Cálculo da linearidade do kit.....	133
Quadro 5 –	Resumo dos resultados do processo de validação dos kits.....	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
ADAMTS-13	Desintegrina e Metaloproteinase com motif tipo1 de Trombospondina-13
ALT	Alanina Aminotransferase
Ang-1	Angiopietina-1
Ang-2	Angiopietina-2
AST	Aspartato Aminotransferase
β HCG	Hormônio Gonadotrofina Coriônica- β
BHT	Hidroxitolueno Butilado
CEAP	Classificação Clínica Etiológica Anatômica e Fisiopatológica
CQ	Controle de Qualidade
CV%	Coefficiente de Variação %
DVC	Doença Venosa Crônica
EDHF	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
EIA	Imunoensaio enzimático
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
<i>ent</i> -PGF _{2α}	<i>ent</i> -Prostaglandina F _{2α}
Gama GT	Gama Glutamil Transpeptidase
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
ICAM-1	Molécula da Adesão Intercelular-1
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Imunoglobulina G
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IMC	Índice de Massa Corporal
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IVC	Insuficiência Venosa Crônica
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
Log-Log	Ajuste logarítmico
MCP-1	Proteína Quimiotática para Monócitos-1

MDA	Malonildialdeído
MMP-2	Metaloproteinase de Matriz-2
MMP-3	Metaloproteinase de Matriz-3
MMP-9	Metaloproteinase de Matriz-9
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NADPH oxidase	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fostato oxidase
NO	Óxido Nítrico
NOS	Oxido Nítrico Sintase
NYHA	New York Heart Association
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAI-1	Inibidor do Ativador do Plasminogênio
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	Proteína C Reativa
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PECAM-1	Molécula de Adesão Plaqueta-Endotélio-1
PGI ₂	Prostaciclina
4PL	Ajuste Logístico de Quatro Parâmetros
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
sEndogлина	Endogлина solúvel
sE-selectina	E-selectina solúvel
sICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1 solúvel
sL-selectina	L-selectina solúvel
SMC	Células Musculares Lisas
sTie-2	Tie-2 solúvel
sTM	Trombomodulina solúvel
uPA	Ativador do Plasminogênio-Uroquinase
sVCAM-1	Molécula de Adesão da Célula Vascular-1 solúvel
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante-
TIMP-1	Inibidor Tecidual de Metaloproteinase-1
tPA	Ativador Tecidual do Plasminogênio
TM	Trombomodulina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α

T ₄	Tiroxina
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
TSH	Hormônio Estimulante da Tireóide
TVP	Trombose Venosa Profunda
UL-vWF	Forma Ultra Grande do Fator de von Willebrand
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VEGFR1	Receptor 1 do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VEGFR2	Receptor 2 do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VCAM-1	Molécula de Adesão da Célula Vascular-1
vWF	Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1	A Doença Venosa Crônica	14
1.1.1	<u>Definição</u>	14
1.1.2	<u>Classificação</u>	15
1.1.3	<u>Sintomas e qualidade de vida</u>	18
1.1.4	<u>Etiologia</u>	18
1.1.5	<u>Epidemiologia</u>	19
1.1.6	<u>Fatores de risco</u>	21
1.1.6.1	História familiar.....	21
1.1.6.2	Idade.....	21
1.1.6.3	Gênero.....	21
1.1.6.4	Gestação.....	22
1.1.6.5	Ocupação.....	22
1.1.6.6	Outros.....	22
1.1.7	<u>Impacto econômico</u>	23
1.1.8	<u>Morfologia das veias</u>	23
1.1.9	<u>Fisiologia e hemodinâmica da circulação venosa</u>	24
1.1.10	<u>O papel do endotélio na homeostase vascular</u>	24
1.1.11	<u>O papel do endotélio na inflamação</u>	28
1.1.12	<u>Mecanismos fisiopatológicos</u>	31
1.1.12.1	Mecanismos fisiopatológicos da doença venosa crônica.....	31
1.1.12.2	Mecanismos fisiopatológicos das manifestações cutâneas da doença venosa crônica.....	32
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo geral	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	PACIENTES E MÉTODOS	38
3.1	Participantes	38
3.2	Crterios de elegibilidade para o estudo	39

3.2.1	<u>Critérios de elegibilidade para os grupos C₂, C₃ e C₄</u>	39
3.2.1.1	Critérios de seleção para os grupos C ₂ , C ₃ e C ₄	39
3.2.1.2	Critérios de não-seleção para os grupos C ₂ , C ₃ e C ₄	39
3.2.1.3	Critérios de inclusão para os grupos C ₂ , C ₃ e C ₄	41
3.2.1.4	Critérios de não inclusão para os grupos C ₂ , C ₃ e C ₄	41
3.2.2	<u>Critérios de elegibilidade para os grupos C_{4m}</u>	42
3.2.2.1	Critérios de seleção para o grupo C _{4m}	42
3.2.2.2	Critérios de não-seleção para o grupo C _{4m}	42
3.2.2.3	Critérios de inclusão para o grupo C _{4m}	44
3.2.2.4	Critérios de não inclusão para o grupo C _{4m}	45
3.2.3	<u>Critérios de elegibilidade para o grupo C_{0a}</u>	45
3.2.3.1	Critérios de seleção para o grupo C _{0a}	45
3.2.3.2	Critérios de não-seleção para o grupo C _{0a}	46
3.2.3.3	Critérios de inclusão para o grupo C _{0a}	47
3.2.3.4	Critérios de não inclusão para o grupo C _{0a}	47
3.3	Visita de seleção	48
3.4	Visita de coleta	48
3.5	Avaliação dos biomarcadores	49
3.5.1	<u>Coleta das amostras biológicas</u>	49
3.5.1.1	Coleta de sangue.....	49
3.5.1.2	Coleta de urina.....	50
3.5.2	<u>Armazenagem das amostras biológicas</u>	50
3.5.2.1	Para amostras de sangue.....	50
3.5.2.2	Para amostras de urina.....	51
3.5.3	<u>Métodos analíticos</u>	51
3.5.3.1	ELISA.....	51
3.5.3.1.1	ELISA formato sanduíche.....	51
3.5.3.1.2	ELISA formato competitivo.....	52
3.5.3.2	Ensaio cromogênico.....	53
3.5.4	<u>Validação do método de ensaio</u>	54
3.5.4.1	Critérios de aceitação.....	54
3.5.4.1.1	Curva de calibração e controles de qualidade.....	54
3.5.4.1.2	Critérios de aceitação para amostras das pacientes.....	55

3.6	Análise estatística	57
4	RESULTADOS	58
4.1	Participantes	58
4.2	Características antropométricas	59
4.2.1	<u>Idade</u>	59
4.2.2	<u>Estatura</u>	60
4.2.3	<u>Massa corporal</u>	61
4.2.4	<u>Índice de massa corporal</u>	62
4.3	Variáveis hematológicas e inflamatórias	63
4.3.1	<u>Eritrócitos</u>	63
4.3.2	<u>Leucócitos</u>	64
4.3.3	<u>Razão leucócitos/eritrócitos</u>	65
4.3.4	<u>Hematócrito</u>	66
4.3.5	<u>Proteína C reativa</u>	67
4.4	Biomarcadores	68
4.4.1	<u>Biomarcador inflamatório</u>	68
4.4.1.1	Interleucina-6.....	68
4.4.2	<u>Biomarcadores de adesão celular</u>	69
4.4.2.1	sL-selectina.....	69
4.4.2.2	sE-selectina.....	70
4.4.2.3	sP-selectina.....	71
4.4.2.4	sICAM-1.....	72
4.4.2.5	sVCAM-1.....	73
4.4.3	<u>Biomarcadores de lesão endotelial</u>	74
4.4.3.1	tPA.....	74
4.4.3.2	Atividade de PAI-1.....	75
4.4.3.3	Fator de von Willebrand.....	76
4.4.3.4	sTrombomodulina.....	77
4.4.4	<u>Biomarcadores de remodelamento tecidual</u>	78
4.4.4.1	MMP-2.....	78
4.4.4.2	MMP-3.....	79
4.4.4.3	MMP-9.....	80
4.4.4.4	TIMP-1.....	81

4.4.4.5	Razão TIMP-1/MMP-2.....	82
4.4.4.6	Razão TIMP-1/MMP-3.....	83
4.4.4.7	Razão TIMP-1/MMP-9.....	84
4.4.5	<u>Biomarcadores de remodelamento vascular</u>	85
4.4.5.1	Angiopietina-1.....	85
4.4.5.2	Angiopietina-2.....	86
4.4.5.3	Razão Angiopietina-1/Angiopietina-2.....	87
4.4.5.4	sTie-2.....	88
4.4.5.5	VEGF.....	88
4.4.5.6	sEndoglina.....	89
4.4.6	<u>Biomarcador de estresse oxidativo</u>	90
4.4.6.1	<i>ent</i> -Prostaglandina F _{2α}	90
5	DISCUSSÃO	92
6	RESUMO DOS ACHADOS	110
	CONCLUSÃO	113
	REFERÊNCIAS	114
	APÊNDICE –Validação do método de análise.....	131

INTRODUÇÃO

Apesar da doença venosa crônica (DVC) ter sido primeiramente reconhecida como doença por Hipócrates no ano de 460 A.C. (citado por Virgini-Magalhães et al., 2006, p. 1037), até hoje a etiologia da forma primária da doença ainda é desconhecida. É uma das doenças mais prevalentes no mundo, afetando aproximadamente 1% da população em geral (Tran e Meissner, 2002). Constitui um problema de saúde comum em vários países (Howlader e Coleridge-Smith, 2003) inclusive no Brasil onde somente no ano de 2004, o Sistema Único de Saúde teve um custo de 43 milhões de reais em cirurgia de varizes (Castro e Silva et al., 2005). A DVC se manifesta por inúmeros sinais e sintomas como dor, lesões tróficas na pele e úlceras venosas que afetam significativamente a qualidade de vida do paciente (Virgini-Magalhães et al., 2006).

A fisiopatologia da DVC é muito complexa e compreende mecanismos que levam à hipertensão venosa, inflamação, dano endotelial, remodelamento da parede venosa, remodelamento vascular e alterações cutâneas. Por isso, conhecer de maneira mais aprofundada as moléculas e vias de sinalização envolvidas nos mecanismos fisiopatológicos da DVC e identificar moléculas (biomarcadores) que se correlacionam direta ou indiretamente com o agravo da doença, constituem uma importante estratégia para a descoberta de alvos terapêuticos que visem não somente aliviar os sintomas como também inibir da progressão da doença.

O presente estudo se propõe a avaliar quais são esses biomarcadores e quais são as suas implicações na fisiopatologia da DVC primária.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A Doença Venosa Crônica

1.1.1 Definição

A doença venosa crônica (DVC) dos membros inferiores abrange um amplo conjunto de sinais e sintomas que variam desde as telangiectasias até as úlceras venosas. A DVC possui etiologia complexa e multifatorial que é resultante de interações entre fatores genéticos e diversos fatores de risco como a história familiar, idade, gênero, número de gestações, obesidade e ortostatismo prolongado (Oklu et al., 2012).

As telangiectasias são vênulas intradérmicas dilatadas com calibre inferior a 1mm e veias reticulares são veias subdérmicas dilatadas, tortuosas e não palpáveis com diâmetro superior a 1mm e inferior a 3 mm. As veias varicosas, veias subcutâneas dilatadas, tortuosas e palpáveis com diâmetro superior a 3 mm, podem ser acompanhadas de edema e de alterações tróficas na pele como, por exemplo, a hiperpigmentação do tornozelo (o qual se torna escurecido devido ao extravasamento de hemácias), lipodermatoesclerose (enrijecimento da pele causado pela fibrose do tecido adiposo subcutâneo) e *atrophie blanche* (tecido cicatricial branco) e eczema venoso (vermelhidão na pele que causa descamação, prurido e coceira) (Eklöf et al., 2004; Castro e Silva et al., 2005; Bergan et al., 2006).

A consequência mais grave da DVC é a úlcera venosa, que se caracteriza por lesão de pele, geralmente localizada na região do maléolo medial, de difícil cicatrização. No início de seu aparecimento ela é superficial com formato irregular. Com a progressão da doença ela pode se tornar profunda e apresentar bordas bem definidas. A pele ao redor dessas úlceras pode ser purpúrica e hiperpigmentada (dermatite ocre), devido ao extravasamento de hemácias da derme e depósito de hemossiderina nos macrófagos (Eklöf et al., 2004; Philips e Dover, 1991; Abbade e Lastória, 2006).

1.1.2 Classificação

Em 1994, o comitê *ad hoc* internacional do *American Venous Forum* (AVF) elaborou a classificação CEAP que leva em consideração aspectos clínicos (C), etiológicos (E), anatômicos (A) e fisiopatológicos (P) da DVC (Quadro 1).

A classificação CEAP teve como principais objetivos uniformizar as informações acerca da DVC as quais podem ser facilmente compreendidas por profissionais nas mais diversas partes do mundo e também melhorar a precisão do diagnóstico e a escolha do tratamento adequado (Eklöf et al., 2004). A classificação CEAP também permitiu estabelecer correlações entre as manifestações clínicas da DVC, os mecanismos fisiopatológicos e a localização anatômica das veias dos membros inferiores (Word, 2010).

Na classificação CEAP são reconhecidas sete categorias clínicas que variam de C₀ a C₆. Indivíduos com classe C₀ não possuem sinais visíveis nem palpáveis da doença. Pacientes com classe C₁ apresentam telangiectasias e veias reticulares e com classe C₂ possuem veias varicosas. Pacientes com classe C₃ apresentam edema enquanto os das classes C_{4a} e C_{4b} possuem alterações cutâneas sem ulceração. Na classe C₅ o membro afetado apresenta úlcera cicatrizada e na classe C₆ apresenta úlcera em atividade (Meissner et al., 2007). Cada classe clínica é seguida da letra S (sintomático) para indicar a presença ou da letra A (assintomático) a ausência de sintomas (Eklöf et al., 2004). A etiologia da DVC pode ser congênita, primária ou secundária. A DVC primária não está associada com nenhum mecanismo identificável de disfunção venosa. Por outro lado, a DVC secundária resulta, geralmente, de um episódio prévio de TVP aguda. A fisiopatologia pode ser decorrente de refluxo ou de obstrução e pode ser localizado precisamente em qualquer parte do sistema venoso das extremidades inferiores conforme designação numérica dos segmentos venosos presentes no Quadro 2 (Meissner et al., 2007).

Além disso, a classificação CEAP não é estática, a DVC pode ser reclassificada após avaliação médica (Eklöf et al., 2004). É importante ressaltar que o termo Doença Venosa Crônica (DVC) inclui todo espectro de sinais e sintomas associados às classes C₀ à C₆ enquanto o termo Insuficiência Venosa Crônica (IVC) é geralmente restrito aos estágios clínicos mais graves (C₄-C₆). Portanto, veias varicosas na ausência de alterações cutâneas não são indicativas de IVC (Bergan et al., 2006).

Quadro 1 - A Classificação CEAP

Classificação Clínica (C)	
C ₀	Nenhum sinal visível ou palpável da doença
C ₁	Telangiectasias e /ou veias reticulares
C ₂	Veias varicosas
C ₃	Edema
C ₄	Alterações na pele e tecido subcutâneo secundárias a DVC. Essa classe se divide em duas sub-classes para melhor avaliação da gravidade da doença.
C _{4a}	Pigmentação e/ou eczema
C _{4b}	Lipodermatosclerose e/ou <i>atrophie blanche</i>
C ₅	Úlcera cicatrizada
C ₆	Úlcera ativa
C _S	Sintomas incluindo dor, compressão, irritação da pele, peso, câibra muscular e outras reclamações associadas a disfunção venosa
C _A	Assintomático
Classificação Etiológica (E)	
E _c	Congênita (Síndrome de Klippel-Trenaunay)
E _p	Primária
E _s	Secundária (Síndrome pós-trombótica, trauma)
E _n	Causa não identificada
Classificação Anatômica (A)	
A _s	Superficial
A _d	Profunda
A _p	Perfurante
A _n	Localização venosa não identificada
Classificação Fisiopatológica (P)	
P _r	Refluxo
P _o	Obstrução, trombose
P _{r,o}	Refluxo e obstrução
P _n	Fisiopatologia venosa não identificada

Fonte: Eklöf et al., 2004.

Quadro 2 - Nome dos 18 segmentos venosos (com designação numérica)

Veias superficiais
(1)Telangiectasias ou veias reticulares (2)Veia safena magna acima do joelho (3)Veia safena magna abaixo do joelho (4)Veia safena parva (5)Veias não safenicais
Veias profundas
(6)Veia cava inferior (7)Veia ilíaca comum (8)Veia ilíaca interna (9)Veia ilíaca externa (10)Veias da pélvis: Gonadais, ligamento redondas e outras (11) Veia Femoral Comum (12) Veia Femoral Profunda (13)Veia Femoral Superficial (14) Veia Poplítea (15) Veias tibiais anterior e posterior e fibular (16) Veias Musculares (gastrocnemias e soleares)
Veias perforantes
(17)Coxa (18) Perna

Fonte: Eklöf et al., 2004.

Apesar da DVC ser uma doença complexa, normalmente o seu diagnóstico é realizado com base no exame clínico e, portanto a classificação clínica (C) é bastante utilizada. Entretanto, para se ter um diagnóstico e tratamento corretos além de uma avaliação clínica precisa é necessário definir as categorias E, A, e P. Para essa finalidade, é realizado o exame de *Duplex Scanning* ou Eco-Doppler que avalia detalhadamente o sistema venoso dos membros inferiores (Eklöf et al., 2004), identificando os mecanismos fisiopatológicos subjacentes como o refluxo, obstrução ou ambos e a localização exata da doença dentro dos sistemas venoso profundo, superficial e perforante (Krishnan e Nicholls, 2005).

1.1.3 Sintomas e qualidade de vida

Sintomas relacionados à DVC incluem dor, sensação de peso, inchaço e cansaço nas pernas, coceira e formigamento, câibras musculares e latejamento (Eklöf et al., 2009; Perrin e Lamelet, 2011) que pioram *per se* a qualidade de vida do paciente (Kurz et al., 2001; Darvall et al., 2012).

A qualidade de vida também é diretamente afetada pelo tempo dispensado às frequentes consultas e aos cuidados médicos que leva o paciente a se ausentar do trabalho podendo em alguns casos levar a perda do emprego (Scott et al., 1995).

A DVC também está associada à depressão e ao isolamento social (Bergan et al., 2006).

Segundo dados oficiais no Brasil, a DVC é 14^a causa de afastamento temporário no trabalho. No ano de 2000 houve 61.000 internações em hospitais públicos e conveniados sendo que dessas, 13.000 foram decorrentes de úlceras abertas (Castro e Silva et al., 2005).

1.1.4 Etiologia

A DVC pode ser classificada em primária ou secundária. Apesar da etiologia e patogênese da DVC primária serem ainda desconhecidas, a incompetência valvular e o refluxo venoso são distúrbios frequentemente observados nessa doença. Durante muito tempo postulou-se que tais alterações antecederiam a dilatação e o enfraquecimento da parede venosa, entretanto, atualmente várias evidências sugerem que as modificações na parede das veias precedem a incompetência valvular (Lim e Davies, 2009).

A DVC secundária comumente se desenvolve após um episódio de trombose venosa profunda (TVP). A maior parte dos segmentos afetados recanalizam entre 6 e 12 meses após o a TVP, levando a alterações luminais crônicas e a combinação de obstrução parcial e refluxo (Meissner et al., 2007).

1.1.5 Epidemiologia

No Brasil, foi avaliada a prevalência de varizes e de doença venosa crônica (DVC) em 1.312 mulheres e 443 homens com idades superiores a 15 anos, na cidade de Botucatu no estado de São Paulo (Maffei et al., 1986). Nesse estudo foi mostrado que as veias varicosas afetavam 47,6% dos participantes (50,9% de mulheres e 37,9% de homens). Além disso, a prevalência de veias varicosas moderadas ou severas foi de 21,2%. As mais severas manifestações de DVC como úlcera venosa cicatrizada ou em atividade ocorreram em 3,6% dos participantes (4,0% de mulheres e 2,3% de homens). Ainda nesse estudo foi observado que a prevalência de DVC aumenta com a idade e número de gestações e é mais alta entre a população de etnia branca.

No Reino Unido, o *Edinburgh Vein Study* demonstrou que as veias varicosas são muito comuns, ocorrendo em um terço da população adulta e que as telangiectasias e veias reticulares afetam 80% da população. Esse estudo mostrou uma prevalência de veias varicosas maior em homens do que em mulheres (33,3% versus 26,2%). Ainda foi demonstrado que a DVC não se correlaciona com classe social e que mudanças no estilo de vida podem afetar sua prevalência (Evans et al., 1999).

Na cidade de San Diego nos Estados Unidos foi realizado um detalhado estudo populacional denominado *San Diego Population Study*. Nesse estudo observaram que as telangiectasias e veias reticulares estavam presentes em 55,9% das mulheres e 43,6% dos homens, as veias varicosas em 27,7% das mulheres e 15,0% dos homens e as alterações tróficas de pele em 5,3% das mulheres e 7,8% dos homens (Criqui et al., 2003).

Mais recentemente também nos Estados Unidos, o *National Venous Screening Program* avaliou a prevalência da doença em 2.234 participantes distribuídos em 40 estados norte-americanos. A idade média dos participantes foi de 60 anos e do total de participantes 77% era de mulheres e 23% de homens. Nesse estudo, 29% dos participantes apresentavam telangiectasias, 23% possuíam varizes, 10% tinham varizes com edema, 7% varizes com alterações tróficas na pele, 1,5% apresentavam úlcera venosa cicatrizada e 0,5% era acometido pela úlcera venosa ativa (McLafferty et al., 2008).

Um estudo epidemiológico na França mostrou que a prevalência de veias varicosas em mulheres é significativamente mais alta do que a de homens, correspondendo a 50,5% e 30,1%, respectivamente (Caperpentier et al., 2004). Entretanto, também foi demonstrado que os homens foram mais afetados por manifestações mais graves de DVC como, por exemplo, alterações tróficas na pele, em relação às mulheres (5,4% versus 2,8%).

Na Itália, outro estudo epidemiológico constatou que as mulheres têm quatro vezes mais propensão a desenvolver telangiectasias do que homens, enquanto os homens têm duas vezes mais risco de terem varizes. A idade foi considerada o maior fator de risco para veias varicosas na população feminina. Mulheres com idade superior a 50 anos são cinco vezes mais suscetíveis a varizes do que mulheres com idade inferior a 29 anos. Foi constatado também que as mulheres que vivem na região sul da Itália (região com temperaturas mais altas que o restante do país) possuem o dobro de chance de desenvolver a DVC (Chiesa et al., 2005).

Em 2012, foram publicados os resultados de um grande estudo populacional envolvendo participantes de várias partes do mundo, incluindo a América Latina, denominado *Vein Consult Program* em que foram incluídos 91.545 indivíduos com idade média de $50,6 \pm 16,9$ anos sendo os mais jovens provenientes do Oriente Médio e os mais idosos oriundos da Europa. A proporção de mulheres foi maior do que a de homens. Foi observado que a DVC afeta grande parcela da população mundial. A frequência de indivíduos C_0 foi maior nos homens do que nas mulheres independentemente da idade e região geográfica. As classes clínicas CEAP C_1-C_3 foram mais prevalentes entre as mulheres não importando o país de origem. Entretanto, a proporção dos estágios mais severos de DVC (C_4-C_6) não foi diferente entre homens e mulheres (Rabe et al., 2012).

1.1.6 Fatores de risco

1.1.6.1 História familiar

Um estudo populacional na França mostrou que a história de varizes em parentes de primeiro grau é o principal fator de risco para veias varicosas tanto em mulheres como em homens (Carpentier et al., 2004).

Pacientes com veias varicosas tem uma probabilidade 21,5 vezes maior de reportar uma história familiar positiva para varizes (Scott et al,1995).

1.1.6.2 Idade

A prevalência da DVC aumenta com a idade (Maffei et al., 1986; Evans et al., 1999; Chiesa et al., 2005).

O risco aumentado de desenvolver veias varicosas com o aumento idade está relacionado a uma combinação de fatores que incluem enfraquecimento dos músculos da panturrilha, diminuição da mobilidade e redução dos componentes da matriz extracelular das veias (Naoum et al., 2007).

1.1.6.3 Gênero

A prevalência das veias varicosas varia enormemente em ambos os gêneros, podendo ser de 2% a 56% em homens e de menos de 1% até 73% em mulheres (Robertson et al., 2008). A maioria dos estudos reporta que as veias varicosas são mais frequentes em mulheres do que homens (Lim e Davies, 2009).

1.1.6.4 Gestação

Durante a gestação, o ganho de peso em virtude do aumento do fluido corporal e aumento da pressão intra-abdominal pode predispor a mulher à formação de veias varicosas. Além disso, a supra-regulação de certos hormônios como relaxina, estrogênio e progesterona causam relaxamento venoso e aumentam a capacitância das veias (Naoum et al., 2007).

Um estudo mostrou que o risco de desenvolvimento de veias varicosas aumenta conforme o número de gestações. Foram reportadas prevalências de 32%, 38%, 43%, 48% e 59% em mulheres com nenhum, um, dois, três, quatro e mais filhos, respectivamente (Laurikka et al., 2002).

1.1.6.5 Ocupação

A ergonomia e o tipo de atividade exercida no trabalho pode ser um fator de risco para DVC. Muitos estudos indicam que o ortostatismo prolongado pode aumentar a prevalência e a severidade da doença (Beebe-Dimmer et al., 2005).

Em Jerusalém, Israel, foi conduzido um estudo envolvendo homens e mulheres na faixa de 20 a 64 anos mostrou que a prevalência de varizes era significativamente mais alta entre os indivíduos que passavam grande parte da sua jornada de trabalho de pé (Abramson et al., 1981). As mulheres foram as que mais relataram possuir ocupações que requeriam ortostatismo prolongado comparado aos homens (31,4% versus 13,6%).

1.1.6.6 Outros

Obesidade e diminuição de mobilidade são fatores de risco controversos para a DVC. Outros fatores como tabagismo, terapia com reposição hormonal de estrogênio, hipertensão e diabetes mellitus provavelmente exacerbam ou contribuem para o aparecimento das veias varicosas (Lim e Davies, 2009).

1.1.7 Impacto econômico

A alta prevalência das veias varicosas e a cronicidade das úlceras venosas têm um impacto considerável nos recursos destinados à saúde (Bergan et al., 2006).

Nos Estados Unidos estima-se, por ano, que as úlceras venosas causem a perda de dois milhões de dias de trabalho e onerem com tratamento cerca de três bilhões de dólares o sistema de saúde (McGuckin et al., 2002).

O custo total com a DVC em países com sistema de saúde desenvolvidos como a Alemanha, França e Reino Unido é de um bilhão de dólares (Nicolaidis, 2000).

Somente no ano de 2004, no Brasil, o Sistema Único de Saúde teve um custo de 43 milhões de reais em cirurgia de varizes (Castro e Silva et al., 2005).

1.1.8 Morfologia das veias

As veias têm como principal função recolher o sangue periférico e conduzi-lo com baixa pressão de volta ao coração constituindo o que é denominado retorno venoso (Salgado et al., 1999; Guyton e Hall, 2011). O sangue presente nos capilares flui para as vênulas pós-capilares, que por sua vez, convergem para vênulas e veias cada vez mais calibrosas, até chegar ao coração (Salgado et al., 1999). Além disso, as veias funcionam como importantes reservatórios de sangue, podendo mobilizar, quando necessário, um grande volume para o coração e é por esse motivo também que são conhecidas como vasos de capacitância. Essa importante função das veias se deve a grande distensibilidade e a reduzida capa muscular de suas paredes (Guyton e Hall, 2011), formadas por três camadas concêntricas: a túnica íntima (mais interna) formada pelas células endoteliais, a túnica média constituída pelas células musculares lisas, elastina e colágeno e a túnica adventícia que apresenta principalmente fibroblastos, colágeno e elastina (Szasz et al., 2007). As veias dos membros inferiores possuem mais fibras musculares do que as dos membros superiores e essa propriedade lhes serve para suportar maiores pressões hidrostáticas (Salgado et al., 1999). As veias de grande calibre possuem uma parede espessa que impede que os nutrientes contidos no sangue se difundam da luz do vaso até as túnicas média e adventícia. Em virtude disso, as veias

apresentam um grande número de *vasa vasorum* que nutrem as camadas mais externas das veias (Salgado et al., 1999; Szasz et al., 2007). Outra importante característica das veias é a presença de válvulas que nada mais são que protusões da túnica íntima das paredes venosas em direção à luz do vaso, cada uma delas com duas cúspides formadas por matriz extracelular revestida pelo endotélio e orientadas de forma a propelir o sangue de volta ao coração e evitar o refluxo sanguíneo (Salgado et al., 1999; Meissner et al., 2007).

1.1.9 Fisiologia e hemodinâmica da circulação venosa

A função primordial da circulação venosa é retornar o sangue para o coração. Para retornar ao coração o sangue flui do sistema venoso superficial para o sistema venoso profundo através do sistema de perfurantes, que conectam as veias superficiais às profundas (Deatrick et al., 2010). Em ortostatismo, o sangue do sistema venoso dos membros inferiores deve superar a ação da gravidade e a pressão torácico-abdominal para retornar à circulação central (Rafetto e Khalil, 2008a). Por isso, as pernas possuem importantes mecanismos que são capazes assegurar o retorno venoso como veremos a seguir:

A pressão venosa é um dos principais fatores que afetam o retorno venoso. Ela é constituída por dois componentes: (1) a pressão hidrostática relacionada à pressão da coluna de sangue existente entre o átrio direito e o pé, normalmente entre 90-100 mmHg e (2) hidrodinâmico associado principalmente às pressões geradas pelas contrações da musculatura da panturrilha que funciona como bomba muscular impulsionando unidirecionalmente o sangue em direção ao coração (França e Tavares, 2003; Bergan et al., 2006; Rafetto e Khalil, 2008).

Além da bomba muscular da panturrilha ainda existem as bombas musculares presentes nos pés e nas coxas, mas a mais importante e eficiente é a da panturrilha, que tem a maior capacitância, gera as mais altas pressões (200 mmHg durante a contração muscular) e é capaz de propelir 40% a 60% do volume venoso em cada contração (Ludbrook, 1966; Meissner et al., 2007). A contribuição da contração da musculatura da coxa para o retorno venoso é mínima em relação à da bomba muscular da panturrilha (Ludbrook, 1966; Meissner et al., 2007). Já a bomba localizada no plexo venoso plantar funciona como uma bomba auxiliar para a bomba muscular da panturrilha (White et al., 1996; Meissner et al., 2007).

A pressão hidrostática e a pressão hidrodinâmica são profundamente influenciadas pela ação das válvulas venosas que asseguram que o sangue se movimente em direção ao coração, evitando o refluxo. Quando as válvulas são incapazes de se fechar completamente ou de, efetivamente, direcionar sangue para o coração, ocorre o acúmulo de sangue, a estase e a congestão das veias das extremidades inferiores. O refluxo das veias perforantes leva ao acúmulo sanguíneo e a distensão das veias do sistema superficial (Deatrick et al., 2010).

Durante a deambulação, a musculatura da panturrilha se contrai comprimindo as veias profundas. Nesse período, as válvulas das veias perforantes se fecham para evitar que as altas pressões no sistema venoso profundo sejam transmitidas para o sistema venoso superficial. Quando ocorre o relaxamento da bomba muscular da panturrilha, a pressão do sistema venoso profundo fica temporariamente inferior à pressão do sistema venoso superficial. O sangue, então, flui das veias superficiais para as veias profundas através das veias perforantes. Assim, por meio de uma ação aspirante e compressora reduz-se a pressão hidrostática venosa de um indivíduo de, aproximadamente, 100 mmHg para 0-30 mmHg durante a deambulação. A disfunção da bomba muscular da panturrilha, associada ou não à disfunção valvular, pode causar a hipertensão venosa. A intensidade da hipertensão venosa está estreitamente relacionada à gravidade da DVC (Tran e Meissner, 2002) e é responsável pela maior parte das manifestações clínicas incluindo edema, lipodermatosclerose, e ulceração (França e Tavares, 2003; Beebe-Dimmer et al., 2005).

1.1.10 O papel do endotélio na homeostase vascular

As células endoteliais são os principais reguladores da homeostase vascular (Michiels, 2003). Graças à sua localização privilegiada na interface entre o sangue e as células da musculatura lisa vascular, as células endoteliais percebem estímulos físicos e químicos oriundos do sangue, parede vascular e interstício e respondem com a produção e liberação de inúmeros fatores envolvidos na regulação do tônus vascular, adesão celular, agregação plaquetária, proliferação das células da musculatura lisa vascular e inflamação da parede vascular (Deanfield et al., 2007).

As células endoteliais exercem um importante papel na modulação do tônus vascular (Vanhoutte, 2003) não apenas liberando agentes vasodilatadores como o óxido nítrico (NO),

prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) como também aumentando o tônus vasoconstrictor via geração de endotelina e prostanóides vasoconstrictores e conversão da angiotensina I em angiotensina II na superfície endotelial (Deanfield et al., 2007).

Furchgott e Zawadski (Furchgott e Zawadski, 1980) foram os primeiros pesquisadores a demonstrar claramente a importância do endotélio para o relaxamento vascular. Eles mostraram que a vasodilatação em resposta à acetilcolina era somente observada nas preparações de anéis de aorta de coelho que tinham o endotélio preservado. Estudos subsequentes revelaram que a vasodilatação induzida pela acetilcolina e outros agentes vasodilatadores era decorrente da liberação de uma substância efêmera que inicialmente ficou conhecida como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (Furchgott et al., 1984). Alguns anos mais tarde, dois grupos de pesquisadores chegaram independentemente à conclusão de que o EDRF era o NO (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987).

O NO é produzido através da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Förstermann e Münzel, 2006). Uma vez produzido pelo endotélio, o NO se difunde para o interior das células musculares lisas causando o relaxamento vascular (Ignarro e Kadowitz, 1985).

Em 1976, foi relatado que uma prostaglandina gerada pelo tecido vascular tinha propriedades vasodilatadoras (Bunting et al., 1976). Posteriormente essa prostaglandina foi identificada como PGI_2 (Whittaker et al., 1976). A PGI_2 causa vasodilatação através do aumento dos níveis de monofosfato adenosina cíclico (AMPC) nas células musculares lisas (Gryglewski *et al.*, 1991).

O terceiro vasodilatador produzido pelo endotélio foi denominado EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio) e ainda não possui identidade química definida (Félétou e Vanhoutte, 2009). É provável que vários fatores distintos possam desempenhar o papel do EDHF em circunstâncias específicas (Laurindo et al., 2005). As identidades mais prováveis do EDHF são: metabólitos do ácido araquidônico derivados do citocromo P450, junções mioendoteliais, íons K^+ e peróxido de hidrogênio (Griffith, 2004; Bryan Jr et al., 2005; Laurindo et al., 2005).

A superfície endotelial, em condições normais, é anti-coagulante e anti-trombótica devido a secreção de importantes fatores que regulam a coagulação do sangue e a função plaquetária. O dano vascular ou a exposição das células endoteliais a certas citocinas ou a

estímulos inflamatórios altera o fenótipo das células endoteliais para pro-coagulante e pro-trombótico (Pearson, 1999; Michiels, 2003).

Os principais agentes anti-agregantes plaquetários produzidos pelo endotélio são o NO e a PGI₂ (Cines et al., 1998) que sinergisticamente aumentam a concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) nas plaquetas, prevenindo a agregação das mesmas (de Graaf et al., 1992). O NO e a PGI₂ são constitutivamente liberados pelas células endoteliais, entretanto a sua síntese é aumentada em resposta a agonistas, principalmente aqueles relacionados ao processo de coagulação como, por exemplo, a bradicinina e a trombina e fatores secretados pelas plaquetas no momento da agregação como o trifosfato de adenosina (ATP), limitando como isso a extensão do trombo em formação (Michiels, 2003).

Em seu estado quiescente, as células endoteliais mantêm a fluidez do sangue através de ativação de numerosas vias anticoagulantes dentre as quais se destaca a via da proteína C/proteína S. Essa via é ativada quando a trombina interage com a trombomodulina (TM), um receptor presente na superfície das células endoteliais. Após sua interação com a trombomodulina, a trombina passa a exercer uma atividade anticoagulante ativando a proteína C. A proteína C ativada forma um complexo com a proteína S, sintetizada pelas células endoteliais e, juntas, inativam uma série de componentes da cascata de coagulação (Stern et al., 1991; Sadler, 1997; Esmon, 2000; Michiels, 2003; Pober e Sessa, 2007). Além disso, o complexo formado entre a trombomodulina e a trombina evita que a trombina exerça sua função pró-coagulante de converter fibrinogênio em fibrina e ativar as plaquetas (Esmon, 1995; Michiels, 2003). A forma solúvel de TM é liberada quando o endotélio é lesado e é considerada como um marcador de lesão endotelial (Constans e Conri, 2006).

A superfície endotelial contém ectonucleotidases que hidrolisam ATP e difosfato de adenosina (ADP), potentes agregantes plaquetários, em AMPc e adenosina e possui ainda sulfato de heparan que se liga à anti-trombina III que inativa a trombina (Pober e Sessa, 2007).

Um dos fatores responsáveis pela agregação plaquetária é o fator de von Willebrand (vWF), glicoproteína produzida e secretada constitutivamente pelas células endoteliais para o plasma, frequentemente utilizada como indicador de lesão endotelial nas desordens vasculares (Wagner, 1990; van Mourik et al., 2002). Grandes quantidades de vWF são armazenadas nos corpos Weibel-Palade e podem ser prontamente exocitadas em resposta a agonistas como a trombina (van Mourik et al., 2002). O vWF possui duas principais funções: carrear e

estabilizar o fator de coagulação VIII no plasma e promover a adesão de plaquetas nos sítios de lesão endotelial (Ruggeri, 1999).

O endotélio também participa do processo de fibrinólise sintetizando e liberando constitutivamente o ativador tecidual do plasminogênio (tPA) que permite a conversão do plasminogênio em plasmina, que degrada os trombos digerindo a rede de fibrina. O inibidor natural do tPA, o inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) também é constitutivamente secretado pelas células endoteliais. Entretanto, após ativação endotelial, seja induzida por citocinas ou por injúria, a síntese e secreção de PAI-1 se eleva, alterando o fenótipo endotelial de anti-coagulante para pró-coagulante (Sidelmann et al., 2000; Michiels, 2003).

1.1.11 O papel do endotélio na inflamação

A inflamação é uma resposta protetora, localizada, deflagrada pela injúria ou destruição dos tecidos, que tem como objetivo eliminar o agente inflamatório ou o tecido danificado. No entanto, a resposta inflamatória deve ser rigorosamente controlada uma vez que, em se tornando inapropriada, exacerbada ou crônica pode levar a diversas condições patológicas (Michiels, 2003).

A inflamação envolve uma série de complexos fenômenos vasculares e celulares como, por exemplo: a dilatação de arteríolas pré-capilares e vênulas com aumento da permeabilidade e do fluxo sanguíneo, exsudação de fluidos e migração de leucócitos para o foco inflamatório (Michiels, 2003).

A migração dos leucócitos do sistema vascular para os locais da injúria ou da infecção é um evento crucial na resposta inflamatória. A entrada dos leucócitos no local da lesão requer mecanismos moleculares que permitam que eles reconheçam esses sítios e estabeleçam contato com o endotélio, com objetivo final de realizar a transmigração endotelial nas vênulas pós-capilares e combater o processo inflamatório ou infeccioso. O reconhecimento desse local pelos leucócitos e a formação do contato com o endotélio são realizados por meio de uma série de moléculas de adesão em combinação com mediadores inflamatórios como as quimiocinas. O processo de adesão dos leucócitos ao endotélio envolve três etapas: rolamento, firme adesão e a transmigração.

As selectinas são moléculas de adesão responsáveis pelo rolamento dos leucócitos ao longo do endotélio e pela agregação entre leucócitos e plaquetas. Existem três tipos de selectinas: a L-selectina ou CD62L, expressa pela grande parte dos leucócitos, a E-selectina ou CD62E, expressa especificamente pelas células endoteliais e a P-selectina ou CD62P, expressa em plaquetas e células endoteliais. Formas circulantes das selectinas são detectadas no plasma de pacientes com doenças inflamatórias (Gearing et al., 1992; Spertini et al., 1992; Gearing e Newman, 1993). A P-selectina é armazenada nos grânulos- α nas plaquetas e nos corpos de Weibel-Palade nas células endoteliais sendo por esse motivo rapidamente translocada para a membrana dessas células após estímulo inflamatório. O aumento da expressão da E-selectina na superfície endotelial ocorre, após indução da transcrição por fatores pró-inflamatórios. Os principais ligantes para as selectinas são glicoproteínas com uma estrutura do tipo sialil-Lewis^x (Foxall et al., 1992). A L-selectina também serve de ligante para a P- e E-selectina (Patel et al., 1995). Quando os leucócitos ficam ativados eles liberam L-selectina no plasma (um fenômeno denominado *shedding*) e passam a expressar integrinas, que são a segunda classe de moléculas de adesão que, juntamente com membros da superfamília das imunoglobulinas, promovem a firme adesão de leucócitos ao endotélio (Yong e Khwaja, 1990). Quando os leucócitos aderem firmemente, eles degranulam e liberam citocinas, enzimas proteolíticas e radicais livres. Os ligantes das integrinas no endotélio podem pertencer a dois grupos: membros da superfamília das imunoglobulinas, como veremos a seguir, e uma variedade de proteínas de matriz extracelular como fibronectina, trombospondina e vitronectina (Krieglstein e Granger, 2001).

A terceira classe de moléculas de adesão pertence à superfamília das imunoglobulinas. Os membros dessa classe incluem as moléculas 1 e 2 de adesão intercelular (ICAM-1 e ICAM-2), molécula 1 de adesão de células vasculares (VCAM-1) e molécula 1 de adesão plaqueta-célula endotelial (PECAM-1). A ICAM-1 é expressa constitutivamente em muitos tipos celulares, mas sua expressão é cuidadosamente regulada nas células endoteliais e exibe uma heterogeneidade entre os leitos microvasculares. Após a ativação das células endoteliais ocorre aumento da expressão de ICAM-1 em sua superfície. A VCAM-1 exibe uma expressão muito baixa em células endoteliais em seu estado basal, entretanto após estimulação por citocinas sua expressão pelas células endoteliais aumenta consideravelmente (Krieglstein e Granger, 2001). Isoformas solúveis de ICAM-1 (Rothlein et al., 1991; Jander et al., 1993; Witkowska e Borawska, 2004) e VCAM-1 (Matsuda et al., 1995; Duits et al., 1996; Südhoff

et al., 1996) podem ser detectadas no sangue e encontram-se mais elevadas em diversos estados patológicos.

Após aderirem firmemente ao endotélio, os leucócitos deixam as veias pós-capilares em direção ao espaço sub-endotelial e ao compartimento intersticial adjacente por um complexo fenômeno denominado transmigração ou diapedese (Granger e Kubes, 1994).

As principais consequências da interação leucócito-endotélio envolvem o extravasamento de proteínas plasmáticas, edema intersticial, diminuição da perfusão tecidual levando a hipóxia (Granger e Kubes, 1994).

Apesar das áreas inflamadas frequentemente possuírem fluxo sanguíneo aumentado, os tecidos apresentam má perfusão sanguínea em decorrência do *plugging* de leucócitos nos capilares, da agregação de plaquetas e leucócitos, edema de células endoteliais e redução da sensibilidade das arteríolas aos vasodilatadores endógenos. A má perfusão sanguínea nos tecidos inflamados é indesejável, pois gera baixa força de cisalhamento (*shear stress*, força que atua na parede vascular em resposta à força tangencial produzida pelo fluxo sanguíneo), amplifica a adesão de leucócitos ao endotélio e reduz o fornecimento de oxigênio, o que pode tornar as células parenquimais mais vulneráveis às ações citotóxicas de leucócitos extravasados (Granger e Kubes, 1994).

A superfície luminal do endotélio, em condições normais, inibe a adesão de leucócitos e com isso exerce um papel fundamental para a regulação das respostas imune e inflamatórias da parede vascular (Rubanyi, 1993). Muitas linhas de evidência convergem para a importância do NO como inibidor endógeno da adesão de leucócitos nas vênulas pós-capilares (Gaboury et al., 1993; Kubes et al., 1991; Suzuki et al., 1991; Kubes et al., 1993; Kurose et al., 1993) e qualquer fator que diminua a biodisponibilidade de NO ativa mecanismos de interação leucócito-endotélio dependentes de integrinas e de ICAM-1 e mobiliza a P-selectina para a superfície da célula endotelial (Gaboury et al., 1993; Gaboury et al., 1994; Kurose et al., 1993).

1.1.12 Mecanismos fisiopatológicos

1.1.12.1 Mecanismos fisiopatológicos da doença venosa crônica primária

Apesar dos importantes avanços acerca do conhecimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DVC primária, a sua patogênese ainda permanece incerta. Entretanto, sabe-se que a incompetência valvular, enfraquecimento da parede venosa e dilatação venosa são fatores associados ao surgimento das veias varicosas (Lim e Davies, 2009). Esses fatores são considerados como causa ou consequência da estase sanguínea que promove a hipertensão venosa nos membros inferiores (Lim e Davies, 2009). A hipertensão venosa crônica pode então causar isquemia, injúria e inflamação da parede vascular, dos tecidos subcutâneos circunjacentes e da pele levando ao aparecimento dos sinais e sintomas clássicos da DVC (Lim e Davies, 2009).

Uma das hipóteses para o surgimento das veias varicosas propõe que a disfunção valvular é a primeira alteração patológica. O refluxo venoso, então, promove estase sanguínea e hipertensão venosa que causa danos à parede venosa, levando ao enfraquecimento e dilatação das veias. Esta dilatação por sua vez separa as cúspides valvulares piorando a incompetência valvular e desencadeando um ciclo vicioso (Sommers e Knaapen, 2006; Meissner et al., 2007; Raffetto e Khalil, 2008b; Lim e Davies, 2009).

As veias varicosas apresentam hipotrofia valvular com alargamento dos anéis (Corcos et al., 1996; Ono et al., 1998; Corcos et al., 2000). Além disso, as válvulas das veias varicosas contêm menos fibras colágenas, perdem suas características visco-elásticas típicas (Psaila e Melhuish, 1989) e apresentam, ainda, infiltração de monócitos indicando a ocorrência de inflamação valvular (Ono et al., 1998).

Apesar das evidências supracitadas, a hipótese de que o aparecimento das veias varicosas ocorre em decorrência da incompetência valvular é muito contestada atualmente. Muitos estudos utilizando métodos histológicos e ultrassonográficos mostraram que, muitas vezes, as varizes aparecem abaixo de válvulas competentes e que o aparecimento das varizes precede a incompetência valvular (Labropoulos et al., 1997; Naoum et al., 2007; Lim e Davies, 2009).

A mais recente hipótese tem se concentrado nas anormalidades estruturais e bioquímicas da parede venosa, postulando que as veias varicosas se desenvolvem secundariamente às alterações da matriz extracelular, que causam enfraquecimento da parede venosa e alteração do tônus venoso (Somers e Knaapen, 2006; Raffetto e Khalil, 2008b; Clarke et al., 1992).

De fato, na parede das veias varicosas são observadas inúmeras alterações histológicas, como: diminuição da parede com espessamento da túnica íntima e desorganização da túnica média (Sayer e Smith, 2004). A túnica adventícia apresenta áreas com aumento do número de células musculares lisas e de fibroblastos, e acúmulo de tecido conjuntivo, com regiões de atrofia e ausência de *vasa vasora* (Meissner et al., 2007). Além disso, ocorre o remodelamento tecidual que altera o conteúdo de laminina (Kirsch et al., 1999), elastina (Gandhi et al., 1993), fibronectina (Kirsch et al., 1999) e colágeno (Waksman et al., 1997) na parede das veias varicosas.

As células musculares lisas provenientes de veias varicosas possuem alteração na expressão das proteínas da matriz extracelular. A expressão de colágeno do tipo I encontra-se aumentada, enquanto a expressão do colágeno do tipo III encontra-se reduzida (Sansilvestri-Morel et al., 1998; Sansilvestri-Morel et al., 2001). O colágeno do tipo I confere maior rigidez e o colágeno do tipo III maior elasticidade à parede venosa. Em virtude disso as veias varicosas apresentam maior rigidez e menor distensibilidade do que as veias normais (Sansilvestri-Morel et al., 2002). A alteração na razão entre o colágeno do tipo I e do tipo III leva ao enfraquecimento e diminuição da elasticidade das veias varicosas (Sansilvestri-Morel et al., 2002).

Os agentes que deflagram as alterações da parede das veias varicosas ainda não são conhecidos. No entanto é provável que muitos fatores como hipóxia, estiramento mecânico e baixa força de cisalhamento estejam envolvidos nesse mecanismo fisiopatológico (Naoum et al., 2007; Michiels et al., 2002)

1.1.12.2 Mecanismos fisiopatológicos das manifestações cutâneas da doença venosa crônica

Desde o início do século passado muitas hipóteses foram postuladas para correlacionar a hipertensão venosa às manifestações cutâneas da DVC.

A primeira delas foi elaborada por John Homans (Homans, 1917) e ficou conhecida como hipótese da estase venosa. Essa hipótese propôs que o acúmulo de sangue estagnado nas veias varicosas poderia causar anóxia e morte celular levando à ulceração venosa. Entretanto, essa hipótese foi contestada por Alfred Blalock (Blalock, 1929), cujos estudos mostraram que o sangue da veia safena do membro inferior afetado de pacientes com DVC unilateral apresentava maior concentração de oxigênio em relação ao membro não afetado. Com base nesses resultados foi concluído que as manifestações cutâneas eram mais provavelmente decorrentes do aumento da oferta de oxigênio do que da anóxia (Pappas et al., 2005).

Com a constatação de que o fluxo sanguíneo e, por conseguinte, os níveis de oxigênio eram mais elevados nas veias varicosas do que nas veias normais, Pratt (Pratt, 1949) hipotetizou a existência de fistulas arteriovenosas que desviam os nutrientes e o sangue rico em oxigênio para fora do plexo da pele, levando a áreas de isquemia e hipóxia, resultando em ulceração venosa. Piulachs e Vidal (Piulachs e Vidal, 1953), através de exames arteriográficos, concluíram que todos os tipos de varizes eram causados por comunicações arteriovenosas congênitas. No entanto, um estudo (Lindemayr et al., 1972) utilizando métodos mais avançados nunca demonstraram a existência desses desvios colocando em dúvida a validade dessa hipótese (Sándor, 2004).

Em 1982, foi proposta a hipótese do manguito de fibrina do inglês "*fibrin cuff hypothesis*" para explicar a etiologia das alterações cutâneas da DVC (Browse e Burnand, 1982). Através de estudos histológicos eles observaram que os capilares alargados em pacientes com DVC apresentavam deposição de fibrina pericapilar. Essa deposição de fibrina ao redor dos capilares ficou conhecida como manguito de fibrina. Eles especularam que a hipertensão venosa levaria ao alargamento das junções comunicantes (*gap junctions*) endoteliais e subsequente extravasamento de fibrinogênio formando os manguitos de fibrina, que funcionariam como uma barreira à difusão de oxigênio e ao fluxo sanguíneo, resultando na morte das células epidérmicas. Apesar dos manguitos de fibrina realmente existirem nunca ficou comprovado que eles agem como uma barreira para difusão do oxigênio e para o fluxo sanguíneo (Pappas et al., 2005).

A insatisfação com a hipótese do manguito de fibrina aliada às subseqüentes observações da redução do número de leucócitos circulantes em amostras de sangue obtidas da veia safena magna de pacientes com DVC levaram a proposição da hipótese do aprisionamento dos leucócitos (Coleridge-Smith et al., 1988). Segundo essa hipótese, a hipertensão venosa desencadearia o aprisionamento dos leucócitos circulantes na

microcirculação venosa. Os leucócitos aprisionados obstruiriam os capilares reduzindo a perfusão sanguínea, levando a hipóxia que promoveria a ativação leucocitária. Com a ativação dos leucócitos aprisionados, haveria degranulação, com liberação de metabólitos tóxicos, que causariam danos à microcirculação e ao tecido cutâneo subjacente. Apesar dos leucócitos ainda não terem sido diretamente observados obstruindo o fluxo capilar, existem fortes evidências de que a ativação dos leucócitos desempenha um papel fundamental na fisiopatologia das manifestações cutâneas da DVC (Sándor, 2004; Pappas et al., 2005).

Forças hemodinâmicas como a hipertensão venosa, estase circulatória e alterações na força de cisalhamento parecem desempenhar um papel importante na ativação da cascata inflamatória, que promove alterações adversas na parede vascular, nas válvulas venosas e na pele (Pascarella et al., 2005; Bergan, 2007).

Como consequência da hipertensão venosa, ocorre o extravasamento de macromoléculas como fibrinogênio, α_2 -macroglobulina e hemácias para o interstício (Thomas et al., 1988b). Os produtos da degradação das hemácias e as proteínas plasmáticas que extravasam para o interstício, são potentes agentes quimiotáticos para leucócitos e, presumivelmente, agem deflagrando a resposta inflamatória crônica (Leu et al., 1995). Esses fatores também são responsáveis por aumentar a expressão de ICAM-1 nas células endoteliais (Leu et al., 1995). O extravasamento plasmático ocasiona sobrecarga linfática, edema além de aumentar a viscosidade sanguínea a formação de agregados de hemácias, levando a diminuição da distribuição dessas células na microcirculação (Boisseau e de La Giclais, 2004).

Como resultado da ativação da cascata inflamatória, ocorre infiltração de neutrófilos, linfócitos T e B, monócitos e mastócitos nas paredes venosas e venulares. Os monócitos/macrófagos também infiltram as válvulas venosas e, possivelmente, promovem a destruição das mesmas. Existem evidências de que ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, L-selectina e as integrinas estejam envolvidas nesse processo (Schmid-Schönbein e Pascarella, 2007).

Os leucócitos ativados sintetizam e liberam inúmeros mediadores inflamatórios como os leucotrienos, prostaglandinas, bradicinina, espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas. Citocinas, como Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e Interleucina-6 (IL-6), atuam regulando e perpetuam a reação inflamatória por mecanismos parácrinos e autócrinos (Schmid-Schönbein e Pascarella, 2007).

Alterações da força de cisalhamento em decorrência de fluxo sanguíneo anormal, induzem a mudanças morfológicas, funcionais e de expressão gênica nas células endoteliais (Ando e Yamamoto, 2009). Quando o fluxo é pulsátil ou laminar, a força de cisalhamento é normal e ocorre ativamente a liberação de fatores que reduzem a inflamação, a formação de trombos e de radicais livres como, por exemplo: NO, tPA, TM e PGI₂. Por outro lado, a força de cisalhamento nula ou de baixa intensidade em consequência de fluxo turbilhonar ou inverso, promove a liberação de radicais livres e de mediadores pró-inflamatórios e pró-trombóticos, como por exemplo: PAI-1, vWF, Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (MCP-1), Angiotensina II e Endotelina-1 (Bergan et al., 2006; Bergan, 2007; Boisseau e de La Giclais, 2004).

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento transformante- β_1 (TGF- β_1) têm sido apontados como importantes agentes que relacionam a inflamação às alterações cutâneas em pacientes com DVC. O VEGF é um potente agente angiogênico e parece ser o responsável pelo aspecto tortuoso e alongado dos capilares da pele com lipodermatosclerose. Além disso, o VEGF aumenta a permeabilidade microvascular e induz a expressão das moléculas de adesão E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (Schmid-Schönbein, 2006) e de Angiopoietina-2 (Brindle et al., 2006). A Angiopoietina-1, através da sua ligação com o receptor Tie-2, bloqueia os efeitos do VEGF (Yancopoulos et al., 2000) e da Angiopoietina-2 (van Meurs et al., 2009) suprimindo o extravasamento plasmático, inibindo a inflamação vascular e prevenindo a morte das células endoteliais (Brindle et al., 2006). Os leucócitos ativados transmigram da vasculatura e liberam TGF- β_1 , que estimula a produção de colágeno pelos fibroblastos dérmicos, levando à fibrose (Pappas et al., 1999). A síntese de colágeno induzida pelo TGF- β_1 é atenuada pela expressão de Endoglina que é uma proteína regulatória do receptor de TGF- β_1 (Lebrin e Mummery, 2008; Bernebeu et al., 2007). Por outro lado, a Endoglina também é capaz de ativar a via de sinalização do TGF- β_1 responsável pela proliferação e migração das células endoteliais (Lebrin e Mummery, 2008; ten Dijke et al., 2008). A Endoglina também é capaz de regular diretamente o comportamento das células endoteliais, modulando a atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), organização do citosqueleto e a via da proteína quinase ativada por mitógeno (Lebrin e Mummery, 2008).

Outros fatores que possuem uma importante correlação entre a inflamação e o remodelamento tecidual são as metaloproteinases de matriz (MMPs). As MMPs são uma família de proteases identificadas em muitos tecidos e órgãos incluindo o tecido venoso. As

MMPs estão envolvidas no processo de renovação do colágeno, elastina e outras proteínas da matriz extracelular. Estudos experimentais em fragmentos de veias varicosas de animais e de humanos têm demonstrado significativas alterações da expressão/atividade de várias MMPs, em associação com o remodelamento da parede vascular. Outros estudos sugerem que o desequilíbrio entre expressão/atividade das MMPs e dos inibidores teciduais das MMPs (TIMPs), pode resultar nas alterações patológicas da parede venosa e das válvulas que podem levar ao surgimento das veias varicosas (Raffetto e Khalil, 2008a).

Em virtude da enorme variedade de moléculas envolvidas nos processos inflamatórios, de adesão celular, de remodelamento tecidual e vascular que ocorrem na progressão da DVC, é provável que existam biomarcadores capazes de correlacionar positivamente ou negativamente com o agravamento da doença. Analisar e descobrir quais deles podem ser utilizados para essa finalidade é o objetivo principal do presente projeto, onde procuramos ver também a importância dos hormônios sexuais e idade, trabalhando com pacientes em uma ampla faixa etária.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Quantificar os biomarcadores no sangue ou urina das participantes do estudo.

2.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos:

- a) Relacionar as concentrações dos biomarcadores e as razões TIMP-1/MMP-2, TIMP-1/MMP-3, TIMP-1/MMP-9 e Angiopoietina-1/Angiopoietina-2 com a gravidade da DVC primária;
- b) Identificar os biomarcadores e vias envolvidas na progressão da DVC primária, a fim de descobrir um possível alvo terapêutico para tratamento da doença.

3 PACIENTES E MÉTODOS

Este estudo seguiu o protocolo de pesquisa clínica nº 2271-CEP/HUPE – CAAE:0014.0.228.000-08 aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ.

3.1 Participantes

Para o presente estudo foram recrutadas 180 mulheres com diagnóstico de DVC primária (classes clínicas CEAP C₂, n=60; C₃, n= 60e C₄, n=60) no membro inferior mais afetado pela doença com idade entre 18 e 50 anos (inclusive), 60 mulheres na pós-menopausa ou ooforectomizadas também com diagnóstico de DVC primária (classe clínica CEAP C₄ na perna mais afetada) com idade entre 50 e 70 anos (inclusive) e 30 voluntárias que não apresentavam nenhum sinal e sintoma de DVC primária (classe clínica CEAP C_{0a}) em ambos os membros inferiores). Esse estudo era uma parte de outro mais complexo que envolvia também a avaliação microcirculação cutânea dos membros inferiores de pacientes com DVC, em virtude disso, o número de participantes de cada grupo foi determinado com base na variação observada em avaliações da microcirculação cutânea de pacientes com DVC, realizadas previamente no laboratório.

3.2 Critérios de elegibilidade para o estudo

3.2.1 Critérios de elegibilidade para os grupos C₂, C₃ e C₄

3.2.1.1 Critérios de seleção para os grupos C₂, C₃ e C₄

Foram critérios de seleção para esses grupos:

- a) Mulheres;
- b) Faixa etária de 18 a 50 anos (inclusive);
- c) Não obesas ($IMC < 30 \text{ kg/m}^2$);
- d) Classes clínicas C₂, C₃ e C₄ de acordo com a classificação CEAP no membro inferior mais afetado;
- e) Ser capaz de cooperar e de fornecer seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes da participação no estudo

3.2.1.2 Critérios de não-seleção para os grupos C₂, C₃ e C₄

Foram critérios de não-seleção para esses grupos:

- a) Incapacidade de cooperar com o estudo;
- b) Gravidez ou amamentação;
- c) Ciclo menstrual ≤ 21 dias ou ≥ 35 dias;
- d) Menopausa;
- e) Uso de contraceptivo inapropriado;
- f) Fumante (>5 cigarros/dia);
- g) Incapacidade de ler e/ou escrever;
- h) Condição psíquica insatisfatória;

- i) Ciclos irregulares, amenorreia ou histerectomia;
- j) Toxicomania ou alcoolismo recente ou atual;
- k) Classe clínica C₀, C₁, C₅ e C₆ de acordo com a classificação CEAP no membro inferior mais afetado;
- l) Anorexia ou extrema magreza ($IMC \leq 18 \text{ kg/m}^2$);
- m) Obesidade ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$);
- n) Histórico médico anterior de TVP;
- o) Histórico médico recente (menos de três meses) de trombose venosa superficial;
- p) Hipertensão arterial tratada não controlada PAD > 90mmHg e/ou pressão arterial sistólica PAS >140mmHg;
- q) Histórico de eventos arteriais agudos;
- r) Doença arterial periférica (índice de pressão tornozelo-braquial $\leq 0,7$);
- s) Diabetes do tipo I ou II;
- t) Doença inflamatória grave: Behçet, lúpus, arterite de Horton e outras vasculites, poliartrite, espondilartrites, esclerodermia;
- u) Infecção dérmica ou manifestação clínica de inflamação de membros inferiores;
- v) Linfedema de membros inferiores;
- w) Edema idiopático;
- x) Mixedema por doença da tireoide: Doença de Basedow, hipotireoidismo;
- y) Insuficiência renal ou insuficiência cardíaca descompensada nos estágios 3 e 4 da classificação NYHA (The Criteria Committee of the New York Heart Association, 1994) ou insuficiência hepática;
- z) Presença de câncer com tratamento atual por quimioterapia ou radioterapia ou histórico recente (menos de três meses) de radioterapia no abdome, pelve e/ou membros inferiores;
- aa) Tratamentos não farmacológicos, não autorizados, recentes (menos de três meses) ou programados para doenças vasculares;
 - Escleroterapia;
 - Tratamento cirúrgico de varizes (crossectomia, fleboextração, flebotomia);
 - Angioplastia;

- Dispositivos endovasculares como laser endovascular, radiofrequência, cateter e *stent*;
- Terapia de compressão;
- Fisioterapia de membros inferiores (incluindo massagem e drenagem linfática).

bb) Tratamentos farmacológicos não autorizados nos últimos três meses;

- Agente anti-inflamatório (exceto ácido acetilsalicílico na dose ≤ 350 mg diária);
- Imunossuppressores e corticosteróides sistêmicos;
- Medicamentos venoativos;
- Pentoxifilina;
- Bloqueadores de canais de cálcio;
- Diuréticos;
- Anticoagulantes;
- Derivados do nitrato.

cc) Qualquer anormalidade clínica e laboratorial.

3.2.1.3 Critérios de inclusão para os grupos C₂, C₃ e C₄

Sujeitos da pesquisa selecionados respeitando todos os critérios de seleção.

3.2.1.4 Critérios de não inclusão para os grupos C₂, C₃ e C₄

Foram critérios de não inclusão para esses grupos:

- a) Presença de obstrução venosa no resultado do Duplex Scan ou Eco-Doppler;

- b) Anormalidades clinicamente significantes nos testes laboratoriais (principalmente nos indicadores de insuficiência renal e/ou doença hepática).

3.2.2 Critérios de elegibilidade para o grupo C_{4m}

3.2.2.1 Critérios de seleção para o grupo C_{4m}

Foram critérios de seleção para esse grupo:

- a) Mulher;
- b) Menopausa ou ooforectomia bilateral por mais de dois anos e menos de 20 anos;
- c) Paciente ambulatorial;
- d) Faixa etária de 50 a 70 anos (inclusive);
- e) DVC primária;
- f) Classe clínica C₄, no membro inferior mais afetado, de acordo com a classificação CEAP;
- g) Sem terapia de reposição hormonal (TRH) anterior ou com duração total equivalente a menos de ¼ do tempo da menopausa ou ooforectomia e interrompida três meses antes da seleção para o estudo;
- h) Capacidade de cooperar e de fornecer seu TCLE antes da participação no estudo.

3.2.2.2 Critérios de não-seleção para o grupo C_{4m}

Foram critérios de não-seleção para esse grupo:

- a) Incapacidade de cooperar com o estudo;
- b) Gravidez;
- c) Fumante (>5 cigarros/dia);
- d) Participação em outro estudo ao mesmo tempo ou no ano anterior;
- e) Sujeito de pesquisa incapaz ler e/ou escrever;
- f) Condição psíquica insatisfatória;
- g) Histórico médico de histerectomia não permitindo a determinação precisa do tempo do início da menopausa;
- h) Toxicomania ou alcoolismo recente ou atual;
- i) Classes clínica C₀, C₁, C₂, C₃, C₅ e C₆ no membro inferior mais afetado, de acordo com a classificação CEAP;
- j) Anorexia ou extrema magreza com índice de massa corpórea (IMC) ≤ 18 kg/m²);
- k) Obesidade (IMC ≥ 30 kg/m²);
- l) Histórico médico anterior de TVP;
- m) Histórico médico recente (menos de três meses) de trombose venosa superficial;
- n) Hipertensão arterial tratada não controlada (Pressão arterial diastólica (PAD) > 90mmHg e/ou pressão arterial sistólica (PAS)>140mmHg);
- o) Evento arterial agudo recente (menos de três meses);
- p) Doença arterial periférica (índice de pressão tornozelo braquial $\leq 0,7$);
- q) Diabetes do tipo I ou II;
- r) Doença inflamatória grave: Behçet, lúpus, arterite de Horton e outras vasculites, poliartrite, espondilartrites, esclerodermia;
- s) Infecção dérmica ou manifestação clínica de inflamação de membros inferiores;
- t) Linfedema de membros inferiores;
- u) Edema idiopático;
- v) Mixedema por doença da tireoide: Doença de Basedow, hipotireoidismo;
- w) Insuficiência renal ou insuficiência cardíaca descompensada nos estágios 3 e 4 da classificação NYHA (The Criteria Committee of the New York Heart Association, 1994) ou insuficiência hepática;

- x) Presença de câncer com tratamento atual por quimioterapia ou radioterapia e histórico recente (menos de três meses) de radioterapia no abdome, pelve, e/ou membros inferiores;
- y) Tratamentos não farmacológicos, não autorizados, recentes (menos de três meses) ou programados para doenças vasculares;
 - Escleroterapia;
 - Tratamento cirúrgico de varizes (crossectomia, fleboextração, flebotomia);
 - Angioplastia;
 - Dispositivos endovasculares como laser endovascular, radiofrequência, cateter e *stent*;
 - Terapia de compressão;
 - Fisioterapia de membros inferiores (incluindo massagem e drenagem linfática).
- z) Tratamentos farmacológicos não autorizados nos últimos três meses;
 - TRH anterior com duração total equivalente a menos de $\frac{1}{4}$ do tempo da menopausa ou ooforectomia;
 - Agente anti-inflamatório (exceto ácido acetilsalicílico na dose ≤ 350 mg diária);
 - Imunossupresores e corticosteróides sistêmicos;
 - Medicamentos venoativos;
 - Pentoxifilina;
 - Bloqueadores de canais de cálcio;
 - Diuréticos;
 - Anticoagulantes;
 - Derivados do nitrato.
- aa) Qualquer anormalidade clínica e laboratorial.

3.2.2.3 Critérios de inclusão para o grupo C_{4m}

Sujeitos da pesquisa selecionados respeitando todos os critérios de seleção.

3.2.2.4 Critérios de não inclusão para o grupo C_{4m}

Foram critérios de não inclusão para esse grupo:

- a) Presença de obstrução venosa no resultado do Duplex Scan ou Eco Doppler;
- b) Anormalidades clinicamente significantes nos testes laboratoriais (principalmente nos indicadores de insuficiência renal e/ou doença hepática).

3.2.3 Critérios de elegibilidade para o grupo C_{0a}

3.2.3.1 Critérios de seleção para o grupo C_{0a}

Foram critérios de seleção para esse grupo:

- a) Mulheres saudáveis;
- b) Voluntária em participar do estudo;
- c) Faixa etária de 18 a 30 anos (inclusive);
- d) IMC entre 18 e 25 kg/m²;
- e) Não apresentar sinais e sintomas de DVC;
- f) Classe clínica CEAP C_{0a} em ambas as pernas (um exame cuidadoso em ambas as pernas foi realizado a fim de detectar qualquer telangiectasia ou veia reticular ou edema e a voluntária foi submetida a um questionário detalhado para detectar qualquer sintoma possivelmente relacionado à DVC);
- g) Capacidade de cooperar e de fornecer seu TCLE antes da participação no estudo.

3.2.3.2 Critérios de não-seleção para o grupo C_{0a}

Foram critérios de não seleção para esse grupo:

- a) Incapacidade de cooperar com o estudo;
- b) Gravidez ou amamentação;
- c) Ciclo menstrual ≤ 21 dias ou ≥ 35 dias
- d) Menopausa;
- e) Fumante (>5 cigarros/dia);
- f) Participação em outro estudo ao mesmo tempo ou no ano anterior;
- g) Sujeito de pesquisa incapaz ler e/ou escrever;
- h) Condição psíquica insatisfatória;
- i) Risco aumentado de DVC, definido como a combinação de dois ou mais fatores entre história familiar de DVC, múltiplas gestações, possuir ocupação que demanda um longo período em ortostatismo e sentada, ausência de atividade física regular e $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$;
- j) Ciclos irregulares, amenorreia ou histerectomia;
- k) Toxicomania ou alcoolismo recente ou atual;
- l) Classes clínicas que não C_{0a} em uma perna;
- m) Histórico médico anterior de TVP;
- n) Histórico médico recente (menos de três meses) de trombose venosa superficial;
- o) Hipertensão arterial tratada não controlada $PAD > 90\text{mmHg}$ e/ou pressão arterial sistólica $PAS > 140\text{mmHg}$;
- p) Histórico de eventos arteriais agudos;
- q) Doença arterial periférica (índice de pressão tornozelo-braquial $\leq 0,7$);
- r) Diabetes do tipo I ou II;
- s) Doença inflamatória grave: Behçet, lúpus, arterite de Horton e outras vasculites, poliartrite, espondilartrites, esclerodermia;
- t) Infecção dérmica ou manifestação clínica de inflamação de membros inferiores;
- u) Linfedema de membros inferiores;
- v) Edema idiopático;

- w) Mixedema por doença da tireoide: Doença de Basedow, hipotireoidismo;
- x) Insuficiência renal ou insuficiência cardíaca descompensada (estágios 3 e 4 da classificação NYHA (The Criteria Committee of the New York Heart Association, 1994) ou insuficiência hepática;
- y) Presença ou histórico médico de câncer;
- z) Tratamentos farmacológicos não autorizados nos últimos três meses;
 - Agente anti-inflamatório (exceto ácido acetilsalicílico na dose ≤ 350 mg diária);
 - Imunossupresores e corticosteróides sistêmicos;
 - Medicamentos venoativos;
 - Pentoxifilina;
 - Bloqueadores de canais de cálcio;
 - Diuréticos;
 - Anticoagulantes;
 - Derivados do nitrato.
- aa) Qualquer anormalidade clínica e laboratorial.

3.2.3.3 Critérios de inclusão para o grupo C_{0a}

Sujeitos da pesquisa selecionados respeitando todos os critérios de seleção.

3.2.3.4 Critérios de não inclusão para o grupo C_{0a}

Foram critérios de não inclusão para esse grupo:

- a) Presença de obstrução venosa no resultado do Duplex Scan ou Eco-Doppler;

- b) Anormalidades clinicamente significantes nos testes laboratoriais (principalmente nos indicadores de insuficiência renal e/ou doença hepática).

3.3 Visita de seleção

Uma vez que as mulheres se voluntariavam para participar do estudo, a visita de seleção para o estudo era agendada. Nessa visita, os médicos realizavam a anamnese e o exame clínico nas mulheres. Além disso, o índice de pressão tornozelo-braquial, os sinais vitais (pressão arterial sentada e frequência cardíaca), medidas antropométricas (circunferências do tornozelo e panturrilha, peso e altura) eram também verificadas e registradas. Caso as mulheres atendessem aos critérios de seleção, elas recebiam a prescrição médica para os seguintes exames laboratoriais: Gonadotrofina coriônica humana- β (β -hCG), glicose, proteínas totais, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), Gama glutamiltransferase (Gama GT), colesterol total, colesterol-lipoproteína de baixa densidade (colesterol-LDL), colesterol lipoproteína de alta densidade (colesterol HDL), triglicerídeos, hormônio estimulante da tireoide (TSH) e tiroxina (T_4) livre e proteinúria. Nessa visita as mulheres também recebiam a prescrição para realização do Duplex-Scan ou Eco-Doppler.

3.4 Visita de Coleta

As mulheres que não apresentavam obstrução venosa nos resultados do Duplex Scan ou Eco-Doppler ou anormalidades não significativas clinicamente nos testes laboratoriais (critérios para não-inclusão) eram incluídas no estudo.

A visita de coleta ocorria durante o período menstrual das pacientes e das voluntárias saudáveis com intuito de evitar que as flutuações hormonais geradas pelas diferentes fases do ciclo menstrual interferissem na interpretação dos resultados dos biomarcadores. Nessa visita, foram realizadas coletas de amostras de sangue e urina para realização de exames

laboratoriais (hemograma completo, proteína C reativa e creatinina urinária), avaliação da concentração sanguínea dos seguintes biomarcadores: sL-selectina, sP-selectina, sE-selectina, sICAM-1, sVCAM-1, IL-6, VEGF, MMP-2, MMP-3, MMP-9 e TIMP-1, Angiopietina-1, Angiopietina-2, sTie-2 e sEndoglina, sTM, vWF, tPA, atividade plasmática de PAI-1 e avaliação da concentração urinária de *ent*-Prostaglandina F_{2α} (*ent*-PGF_{2α}).

3.5 Avaliação dos biomarcadores

3.5.1 Coleta das amostras biológicas

Amostras de sangue e urina foram coletadas no dia da visita de coleta para avaliação dos diferentes biomarcadores.

3.5.1.1 Coleta de sangue

Pela manhã em jejum, um total de 33 ml de sangue de cada participante do estudo foram coletados da veia braquial e processados conforme os procedimentos abaixo:

Para obtenção do soro foram coletados três tubos tipo *Vacutainer*[®] SST de 5ml. O sangue foi deixado em repouso na bancada a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir a formação do coágulo e, após esse período, centrifugado à 1.000g por 15 minutos à 22°C (centrífuga refrigerada *Eppendorf AG*, Hamburg, Alemanha). Em seguida, 500 µl de soro foram aliqüotados em 13 criotubos. Essas aliqüotas de soro foram destinadas a determinação da concentração de sE-selectina, sL-selectina, sICAM-1, sVCAM-1, MMP-2, MMP-3, TIMP-1, IL-6 e sEndoglina.

Para obtenção de plasma citratado, foram coletados dois tubos *Vacutainer*[®] de 4ml com citrato de sódio. O sangue foi centrifugado, dentro de no máximo 30 minutos após coleta, a 1.000g por 15 minutos à 22°C (centrífuga refrigerada *Eppendorf AG*, Hamburg, Alemanha). Em seguida, foi realizada no plasma uma centrifugação adicional, nas mesmas condições da

centrifugação anterior, para eliminação total das plaquetas. Com o término da centrifugação, 500 µl de plasma citratado foram alíquotados em oito criotubos. As alíquotas de plasma citratado foram destinadas à determinação da concentração de sP-selectina, sTM, tPA, vWF e atividade de PAI-1.

Para obtenção do plasma heparinizado foi coletado um tubo *Vacutainer*® de 10 ml com heparina sódica. O sangue foi centrifugado, dentro de no máximo 30 minutos após coleta, a 1.000g por 15 minutos à 22°C (centrífuga refrigerada *Eppendorf AG*, Hamburg, Alemanha). Em seguida, foi realizada no plasma uma centrifugação adicional, nas mesmas condições da centrifugação anterior, para eliminação total das plaquetas. Com o término da centrifugação, 500 µl de plasma heparinizado foram alíquotados em oito criotubos. As alíquotas de plasma heparinizado foram destinadas à determinação da concentração de Angiopietina-1, Angiopietina-2, sTie-2, MMP-9 e VEGF.

3.5.1.2 Coleta de urina

Durante a visita de coleta uma amostra de cerca de 20 ml de urina foi coletada em um coletor de urina. Do volume total de urina, duas alíquotas de 5 ml foram separadas para análise de *ent*-PGF_{2α} e o volume restante foi encaminhado para o laboratório de análises clínicas para determinação da concentração urinária de creatinina.

3.5.2 Armazenagem das amostras biológicas

3.5.2.1 Para as amostras de sangue

Todas as alíquotas foram imediatamente armazenadas no freezer -80°C (Revco, Thermo Fisher Scientific, LLC, EUA) até a análise, com exceção daquelas destinadas à determinação das concentrações de sP-selectina, sL-selectina e sTM estocadas a -20°C devido a curta estabilidade desses biomarcadores nas amostras.

3.5.2.2 Para as amostras de urina

Em cada uma das alíquotas de 5 ml destinadas à análise de *ent*-PGF_{2α} foram adicionados 50 µl de uma solução de 3,5 di tert butil hidroxitolueno (BHT, *Supelco Analytical*, Bellefont, PA, EUA) a 5 mg/ml para evitar a formação oxidativa *ex vivo* desse biomarcador e imediatamente armazenadas no freezer -80°C (*Revco, Thermo Fisher Scientific, LLC*, Waltham, MA, EUA).

3.5.3 Métodos analíticos

3.5.3.1 ELISA

No presente estudo, a maioria das análises das concentrações dos biomarcadores biológicos foi realizada através de kits de ELISA disponíveis comercialmente, respeitando-se as instruções e orientações fornecidas pelos fabricantes dos kits.

3.5.3.1.1 ELISA formato sanduíche

Os biomarcadores sL-selectina, sP-selectina, sE-selectina, sICAM-1, sVCAM-1, IL-6, VEGF, MMP-2, MMP-3, MMP-9 e TIMP-1, Angiopoietina-1, Angiopoietina-2, sTie-2 e sEndoglina foram dosados por meio de kits de ELISA Quantikine® (*R & D Systems*, Minneapolis, MN, EUA) e os biomarcadores sTM, vWF e tPA foram quantificados por kits de ELISA Imubind® (*American Diagnostica*, Stamford, CT, EUA). Para a quantificação de IL-6 foram utilizados kits de alta sensibilidade

No formato sanduíche, anticorpos específicos contra o biomarcador a ser analisado revestem as cavidades das microplacas de 96 poços e capturam especificamente moléculas desse biomarcador, em outras palavras do antígeno de interesse, presentes nos padrões,

controles de qualidade (CQs) e amostras das pacientes. Após um período de incubação que permite que as ligações entre o antígeno de interesse e anticorpos presentes na placa se estabeleçam, é realizada a lavagem da placa para remover ligações inespecíficas fracas. Posteriormente, anticorpos de detecção conjugados às enzimas peroxidase ou fosfatase alcalina são adicionados à placa e se ligam ao complexo antígeno-anticorpo formado durante a etapa anterior de incubação. Após incubação com o anticorpo de detecção e mais um ciclo de lavagem, são adicionados à placa os substratos das enzimas com os cromógenos apropriados. Durante um breve período de incubação, as enzimas conjugadas presentes em cada padrão de concentração, CQs e amostras reagem com seus substratos e o produto da reação, uma vez formado, reage com o cromógeno promovendo o aparecimento de uma coloração cuja intensidade é diretamente proporcional à atividade enzimática e consequentemente à concentração dos biomarcadores nos padrões de concentração, CQs e amostras. Ao final da incubação com o substrato e o cromógeno, a reação enzimática é inibida com a adição de uma solução ácida e determinada a densidade óptica, no comprimento de onda adequado, em cada uma das 96 cavidades da microplaca através do leitor universal de microplacas (Bio Tek modelo ELX 800, Winooski, VT, EUA).

A concentração de cada biomarcador em cada replicata da amostra é determinada fazendo a interpolação do valor de densidade óptica da mesma com os valores de densidade óptica da curva-padrão gerada através do ajuste logístico de 4 parâmetros (4-PL), logarítmico (Log-Log) ou linear (dependendo do biomarcador) com auxílio de um programa de análise de dados (KC Junior, Bio Tek, Winooski, VT, EUA). Como cada amostra é analisada em duplicata, o valor de concentração de cada amostra é dado pela média entre as duas replicatas multiplicada pelo fator de diluição das amostras.

3.5.3.1.2 ELISA formato competitivo

O kit utilizado para quantificar a *ent*-PGF_{2α} urinária (*Cayman Chemicals*, Ann Arbor, MI, EUA) possuía formato competitivo que consiste em duas etapas. Na primeira etapa são adicionadas à placa a *ent*-PGF_{2α} conjugada à enzima acetilcolinesterase (AChE) a uma concentração fixa, *ent*-PGF_{2α} livre em concentrações variáveis presentes nos padrões de concentração, nos CQs e nas amostras das pacientes e anti-soro de coelho. Nessa etapa, a *ent*-

PGF_{2α} conjugada a AChE e a *ent*-PGF_{2α} livre competem pelos sítios de ligação em anticorpos (imunoglobulinas G, IgGs) presentes no anti-soro de coelho. Os complexos antígeno-anticorpo formados entre a *ent*-PGF_{2α}-AChE ou *ent*-PGF_{2α} livre e as IgGs de coelho se ligam ao anticorpo monoclonal de camundongo anti-IgG de coelho que revestem o fundo de cada cavidade da placa de 96 poços. Após o período de incubação, a placa é lavada para remover ligações inespecíficas e o reagente de Ellman é adicionado à placa. O reagente de Ellman é composto por acetiltiocolina (substrato da AChE) e 5,5'-ditio-*bis*-(ácido 2 nitrobenzoico). A hidrólise de acetiltiocolina pela AChE produz tiocolina que reage com 5,5'-ditio-*bis*-(ácido 2 nitrobenzoico) gerando 5-tio-ácido 2 benzoico, um composto de coloração amarela que absorve intensamente os comprimentos de onda entre 405 e 420nm.

A intensidade de coloração gerada é diretamente proporcional à concentração de *ent*-PGF_{2α}-AChE e inversamente proporcional à concentração de *ent*-PGF_{2α} livre.

A leitura das densidades ópticas do ensaio foi realizada a 405nm por meio do leitor universal de microplacas (Bio Tek modelo ELX 800, Winooski, VT, EUA). A curva-padrão foi gerada através do ajuste de 4-PL utilizando *software* do equipamento (KC Junior, Bio Tek, Winooski, VT, EUA). O resultado de cada amostra foi calculado pela média de concentração entre as duplicatas multiplicadas por 10 (fator de diluição das amostras).

Posteriormente, os resultados de *ent*-PGF_{2α} urinária foram normalizados pela concentração da creatinina urinária através da seguinte fórmula:

$$\textit{ent}\text{-PGF}_{2\alpha} \text{ (pg/}\mu\text{mol de creatinina)} = \frac{\textit{ent}\text{-PGF}_{2\alpha} \text{ (pg/mL)}}{\text{creatinina (g/L)} \times 8,85} \quad (1)$$

3.5.3.2 Ensaio cromogênico

Spectrolyse® PAI-1 é um ensaio cromogênico indireto para avaliação da atividade de PAI-1 humano no plasma que se processa em dois estágios. No primeiro estágio, uma concentração fixa de tPA é adicionada aos padrões de concentração, CQs e amostras. O tPA então reage com o PAI-1 presente nos padrões de concentração, CQs e amostras os quais na próxima etapa são acidificados para destruir o alfa-2-antiplasmina que pode interferir no ensaio. No segundo estágio, atividade residual do tPA é determinada pela adição de uma solução contendo gli-plasminogênio humano, poli-D-lisina e o substrato cromogênico para a

plasmina. O tPA residual (estimulado pela poli-D-lisina) catalisa a conversão de plasminogênio em plasmina que por sua vez hidrolisa o substrato cromogênico. A intensidade de coloração gerada, verificada a 405nm pelo leitor de microplacas (Bio Tek modelo ELX 800, Winooski, VT, EUA) e calculada através do ajuste linear (*Software* KC Junior, Bio Tek, Winooski, VT, EUA) é inversamente proporcional à quantidade de PAI-1 presente nos padrões de concentração, CQs e amostras. Uma unidade de atividade (UI) de PAI-1 é definida como a concentração de PAI-1 capaz de inibir uma unidade internacional (UI) de tPA.

3.5.4 Validação do método de ensaio

Para cada biomarcador, foi realizado o procedimento de validação do método do ensaio no intuito de averiguar se a precisão intra-ensaio e inter-ensaio, linearidade e valores normais esperados das amostras biológicas estavam em conformidade com o declarado pelo fabricante do kit. A validação nos permitiu selecionar o melhor ajuste para curva de calibração, ajustar as sensibilidades dos kits de acordo com as condições experimentais de nosso laboratório e alterar o fator de diluição das amostras em função dos valores normais esperados obtidos. Os procedimentos e resultados da validação de cada biomarcador encontram-se descritos no APÊNDICE. No Quadro, 3 estão resumidos alguns dos dados relacionados à análise dos biomarcadores: método de ensaio, kits e fabricantes, espécimes utilizados, fator de diluição, ajuste adotado para gerar a curva de calibração e os cuidados com a armazenagem das amostras.

3.5.4.1 Critérios de aceitação

3.5.4.1.1 Curva de calibração e controles de qualidade

Para a curva de calibração ser validada, 75% dos pontos da curva-padrão deveriam apresentar uma recuperação $[(\text{valor mensurado}/\text{valor teórico}) \times 100]$ entre 85% e 115%.

No caso da utilização de dois CQs com níveis de concentração diferentes, três de quatro replicatas dos CQs deveriam estar dentro da faixa estabelecida pelo fabricante. Com relação aos CQs com três níveis de concentração, quatro das seis replicatas deveriam estar na faixa declarada pelos fabricantes e nesse caso, as duas replicatas que estavam fora das especificações não poderiam estar no mesmo nível de concentração. No caso do vWF e de PGF_{2α} cujos fabricantes não forneciam os CQs, nós preparamos dois CQs com níveis de concentração diferentes a partir da solução dos padrões de concentração. Desde o início do estudo, uma mesma faixa de concentração para cada nível foi estabelecida e três das quatro replicatas dos CQs deveriam estar dentro dos valores estabelecidos.

Para os ensaios serem validados ambos os critérios de aceitação propostos para curva-padrão e para os CQs deveriam ser atendidos, caso contrário o ensaio era invalidado e deveria ser repetido.

3.5.4.1.2 Critérios de aceitação para as amostras das pacientes

As amostras cujas médias estavam dentro da curva padrão foram aceitas. Quando uma das amostras excedia o valor do padrão de concentração mais alto, essa amostra era novamente analisada, diluída, em um fator de diluição mais elevado. Além disso, as discrepâncias entre duplicatas da mesma amostra não poderiam superar coeficiente de variação (CV%) de 15%. Se o CV% entre duplicatas fosse superior a 15%, a amostra era novamente analisada.

$$CV\% = 100 \times \frac{\text{Desvio-padrão entre duplicatas}}{\text{Média da concentração das duplicatas}} \quad (2)$$

Quadro 3 – Biomarcadores/Método analítico/Kits/Espécimes/Fator de diluição/Ajuste da curva/Armazenagem

Biomarcador	Método Analítico/Kit	Espécime	Fator de diluição	Ajuste da curva de calibração	Armazenagem
sE-selectina	ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	Soro	10	4-PL	Estável a -80° C por tempo indeterminado
sP-selectina	ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	Plasma citratado	2	4-PL	Estável a -20°C por 4 semanas
sL-selectina	ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	Soro	100	4-PL	Estável a -20°C por 4 semanas
sICAM-1	ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	Soro	20	4-PL	Estável a -80° C por tempo indeterminado
sVCAM-1	ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	Soro	20	Log-Log	Estável a -80° C por tempo indeterminado
MMP-2	ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	Soro	10	Log-Log	Estável a -80° C por tempo indeterminado
MMP-3	ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	Soro	10	Log-Log	Estável a -80° C por tempo indeterminado
MMP-9	ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	Plasma heparinizado	100	4-PL	Estável a -80° C por tempo indeterminado
TIMP-1	ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	Soro	100	4-PL	Estável a -80° C por tempo indeterminado
vWF	ELISA, Imubind® (American Diagnostica Inc)	Plasma citratado	200	4-PL	Estável a -80° C por tempo indeterminado
PAI-1	Ensaio Cromogênico, Spectrolyse® (American Diagnostica Inc)	Plasma citratado	1	Linear	Estável a -80°C por até 6 meses
tPA	ELISA, Imubind® (American Diagnostica Inc)	Plasma citratado	1	Linear	Estável a -80°C por até 6 meses
sTM	ELISA, Imubind® (American Diagnostica Inc)	Plasma citratado	4	4-PL	Estável a -20°C por 4 semanas
VEGF	ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	Plasma heparinizado	1	4-PL	Estável a -80° C por tempo indeterminado
IL-6	High Sensitivity ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	Soro	1	Log-Log	Estável a -80° C por tempo indeterminado
Ang-1	ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	Plasma heparinizado	10	Log-Log	Estável a -80° C por tempo indeterminado
Ang-2	ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	Plasma heparinizado	5	4-PL	Estável a -80° C por tempo indeterminado
sTie-2	ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	Plasma heparinizado	10	Log-Log	Estável a -80° C por tempo indeterminado
sEndoglina	ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	Soro	1	4-PL	Estável a -80° C por tempo indeterminado
ent-PG F _{2α}	ELISA / Cayman Chemicals	Urina	10	4-PL	Estável a -80° C por tempo indeterminado Observação: Adicionar 10 µl de uma solução de BHT 5 mg/ml para cada ml de urina.

Fonte: A autora, 2013.

3.6 Análise estatística

A Análise estatística foi realizada através do programa *Graph Pad® Prism* versão 5.0 (Graph Pad®, La Jolla, CA, EUA). Foi utilizado o teste estatístico, *D'Agostino & Pearson* para verificar se os resultados apresentavam a distribuição normal de frequência. Como quase todos os resultados obtidos não apresentavam essa distribuição, foi utilizado o teste estatístico não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* para identificar a existência de diferenças estatísticas entre os grupos. Uma vez existindo essa diferença, era realizado o teste de múltiplas comparações de *Dunn* para determinar exatamente entre quais grupos existiam as diferenças estatísticas. Para análise estatística das variáveis estatura, massa corporal, índice de massa corporal, eritrócitos, hematócrito, sEndogлина, sP-selectina, TIMP-1/MMP-2, PAI-1 e vWF, as quais apresentaram distribuição normal de frequência, foi utilizado o teste estatístico paramétrico *One-way ANOVA* com teste de *Tukey* para múltiplas comparações. O grau de significância estatística adotado foi $P < 0,05$.

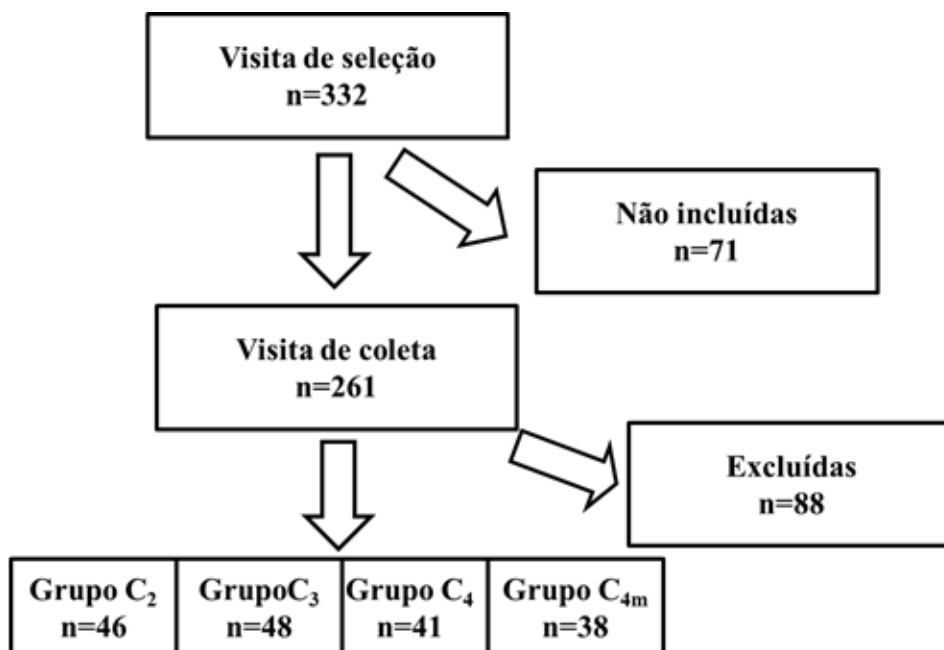
Os resultados das variáveis paramétricas estão descritos como média \pm EPM (erro padrão da média) e os resultados das variáveis não-paramétricas estão expressos como mediana [25°-75° percentis].

4 RESULTADOS

4.1 Participantes

Para participação no estudo, 332 mulheres foram selecionadas dos ambulatórios de Cirurgia Vascular do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) e da Policlínica Piquet Carneiro ambos pertencentes à Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Desse total, 71 não foram incluídas por apresentarem anormalidades bioquímicas ou hormonais nos exames de sangue ou obstrução venosa no Eco-Doppler. Sendo assim, as 261 mulheres restantes foram distribuídas nos grupos C₂, C₃, C₄ e C_{4m} de acordo com a classificação clínica CEAP e realizaram a visita ao Laboratório para coleta do sangue para exames hematológicos, PCR e biomarcadores sanguíneos e amostras de urina para avaliação de creatinina urinária e do biomarcador urinário (*ent*-PGF_{2α}). Com base nos elevados níveis de PCR (acima de 0,5mg/dl), 88 pacientes foram excluídas da avaliação dos biomarcadores e, portanto para essa análise foram levadas em consideração 46 pacientes C₂, 48 pacientes no C₃, 41 pacientes C₄ e 38 C_{4m} conforme ilustrado na Figura 1.

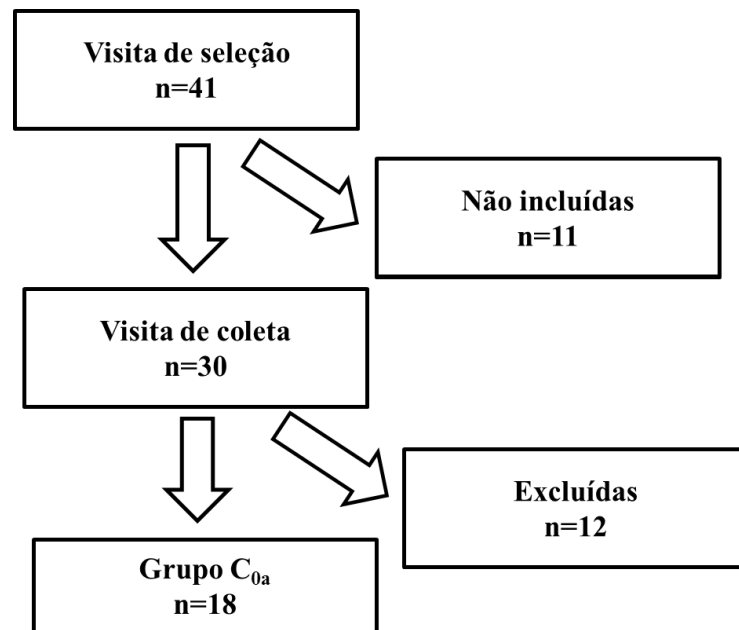
Figura 1- Recrutamento das pacientes C₂, C₃, C₄ e C_{4m} para o estudo



Fonte: A autora, 2013.

Para o grupo C_{0a} foram selecionadas 41 estudantes da UERJ e destas, 30 foram incluídas no estudo. Após verificação dos resultados dos exames laboratoriais, foi constatado que 12 voluntárias apresentavam PCR alta (superior a 0,50 mg/dl) e foram excluídas da avaliação dos biomarcadores. Desse modo, o número de voluntárias no grupo C_{0a} passou a ser 18, conforme ilustrado no esquema abaixo (Figura 2).

Figura 2 - Recrutamento das voluntárias saudáveis para o estudo



Fonte: A autora, 2013.

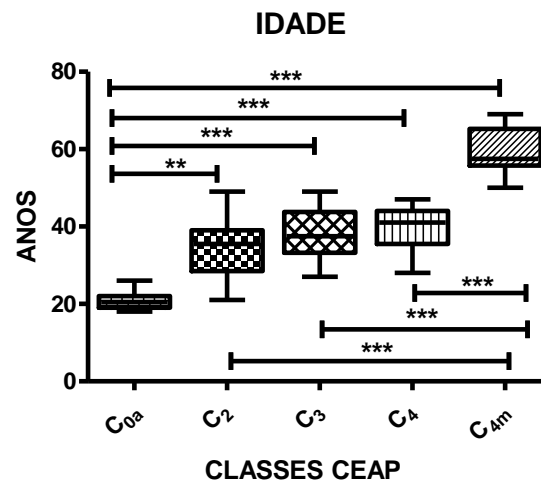
4.2 Características antropométricas

4.2.1 Idade

A faixa etária entre os grupos foi gradativamente crescente conforme ilustrado no Gráfico 1. No grupo C_{0a} (20,50[19,00-22,00] anos), a faixa etária foi significativamente ($p < 0,01$) menor que a do grupo C₂ (35,50[28,50-39,00] anos) e significativamente menor ($p < 0,001$) que a dos grupos C₃ (37,50[33,25-43,75] anos), C₄ (41,00[35,50-44,00] anos) e C_{4m} (57,50[55,75-65,25] anos). Foi encontrada também diferença estatística ($p < 0,001$) entre os grupos C₂ vs. C_{4m}, C₃ vs. C_{4m} e C₄ vs. C_{4m}. Entre os grupos C₃ e C₄ não foi encontrada diferença estatística.

Apesar de existirem diferenças estatísticas entre os grupos, todas as participantes se encontravam dentro das faixas etárias estabelecidas para sua classe clínica, respeitando o critério de seleção para a idade.

Gráfico 1- Comparação entre as faixas etárias dos grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}

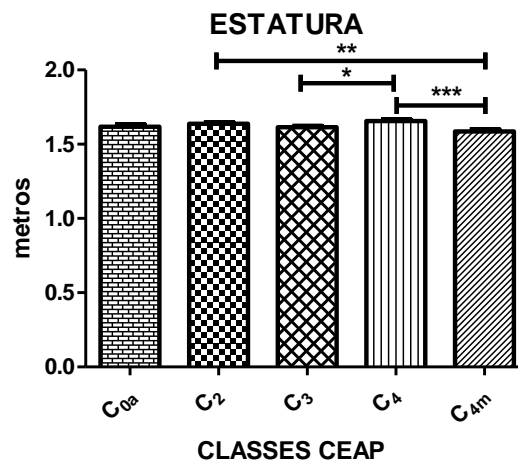


Nota: ** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,01$.
 *** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2013.

4.2.2 Estatura

No Gráfico 2, mostramos a estatura de cada grupo estudado. A estatura do grupo C₂ ($1,638 \pm 0,010$ m) foi estatisticamente maior ($p < 0,01$) do que a do grupo C_{4m} ($1,587 \pm 0,012$ m). Além disso, a altura do grupo C₃ ($1,615 \pm 0,008$ m) foi significativamente inferior ($p < 0,05$) a do grupo C₄ ($1,656 \pm 0,009$ m) e a estatura do grupo C₄ foi estatisticamente maior ($p < 0,001$) a do grupo C_{4m}. Os grupos C_{0a} ($1,618 \pm 0,014$ m) vs. C₂, C_{0a} vs. C₃, C_{0a} vs. C₄, C_{0a} vs. C_{4m}, C₂ vs. C₃, C₂ vs. C₄ e C₃ vs. C_{4m} não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si.

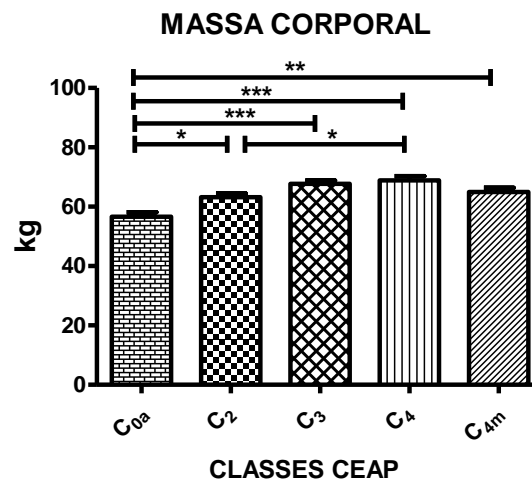
Gráfico 2- Comparação entre as estaturas dos grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}

Nota: * Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,05$.
 ** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,01$.
 *** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2013.

4.2.3 Massa corporal

A massa corporal de cada grupo estudado está representada no Gráfico 3. A massa corporal do grupo C_{0a} ($56,61 \pm 1,53$ kg) foi estatisticamente menor ($p < 0,05$) em relação à do grupo C₂ ($63,19 \pm 1,29$ kg), significativamente inferior ($p < 0,001$) em comparação aos grupos C₃ ($67,70 \pm 1,06$ kg) e C₄ ($68,88 \pm 1,44$ kg) e foi estatisticamente menor ($p < 0,01$) em relação ao grupo C_{4m} ($64,99 \pm 1,40$ kg). O grupo C₂ apresentou massa corporal significativamente menor ($p < 0,05$) em relação ao grupo C₄. Entretanto, os grupos C₂ vs. C₃, C₂ vs. C_{4m}, C₃ vs. C₄, C₃ vs. C_{4m} e C₄ vs. C_{4m} não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Gráfico 3 - Comparação entre a massa corporal dos grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}

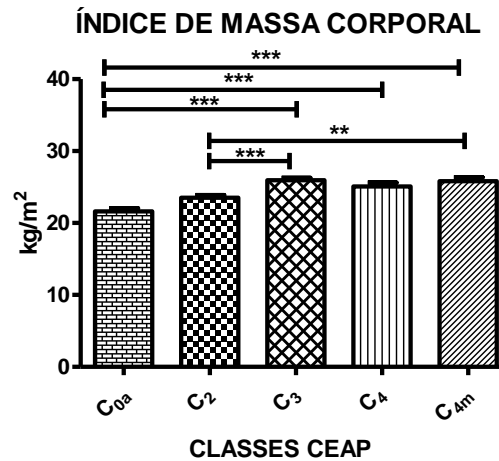
Nota: * Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,05$.
 ** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,01$.
 *** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2013.

4.2.4 Índice de massa corporal

Os índices de massa corporal (IMC) dos grupos estudados estão representados no Gráfico 4. O IMC do grupo C_{0a} ($21,60 \pm 0,44 \text{ kg/m}^2$) foi estatisticamente inferior ($p < 0,001$) em relação aos grupos C₃ ($25,95 \pm 0,33 \text{ kg/m}^2$), C₄ ($25,09 \pm 0,52 \text{ kg/m}^2$) e C_{4m} ($25,83 \pm 0,51 \text{ kg/m}^2$). Além disso, o grupo C₂ ($23,52 \pm 0,44 \text{ kg/m}^2$) apresentou IMC significativamente menor ($p < 0,01$) do que o do grupo C_{4m}. Entretanto, os grupos C_{0a} vs. C₂, C₂ vs. C₄, C₃ vs. C₄, C₃ vs. C_{4m} e C₄ vs. C_{4m} não apresentaram nenhuma diferença estatística entre si.

Apesar de haver diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, todas as participantes do estudo não eram obesas, respeitando-se, portanto, o critério de seleção de IMC entre 18 e 25 kg/m^2 para o grupo C_{0a} e de IMC entre 18 e 30 kg/m^2 para os demais grupos estudados.

Gráfico 4 - Comparação entre os índices de massa corporal dos grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}

Nota: ** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,01$.
 *** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,001$.

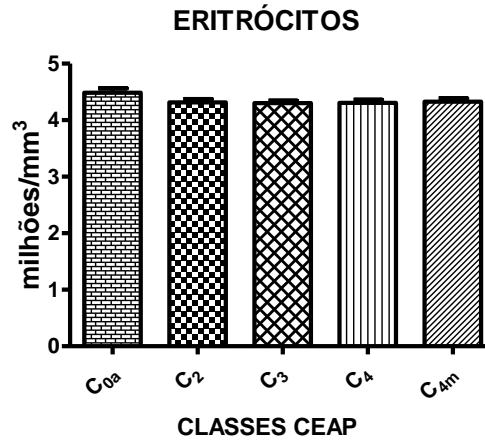
Fonte: A autora, 2013.

4.3 Variáveis hematológicas e inflamatórias

4.3.1 Eritrócitos

O número de eritrócitos circulantes no sangue periférico das participantes dos diferentes grupos estudados encontra-se ilustrado no Gráfico 5. A média do número de eritrócitos/mm³ dos grupos C₂ ($4,31 \pm 0,06$ milhões/mm³), C₃ ($4,30 \pm 0,04$ milhões/mm³), C₄ ($4,30 \pm 0,05$ milhões/mm³) e C_{4m} ($4,33 \pm 0,06$ milhões/mm³) foi semelhante. Apesar do grupo C_{0a} ($4,49 \pm 0,08$ milhões/mm³) apresentar a média do número de eritrócitos/mm³ superior à dos demais grupos, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Gráfico 5 - Comparação entre o número de eritrócitos circulantes no sangue periférico das participantes dos grupos C_{0a} , C_2 , C_3 , C_4 e C_{4m} .

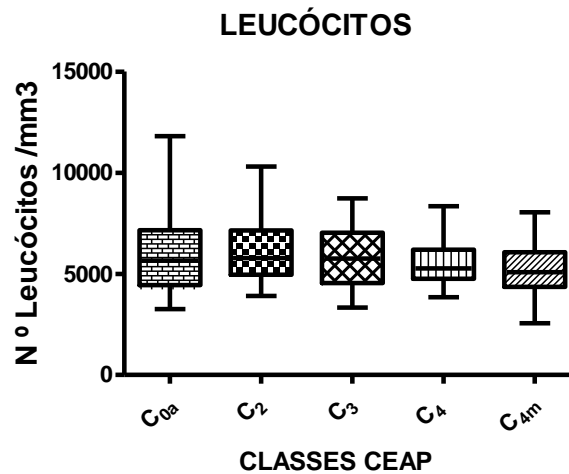


Fonte: A autora, 2013.

4.3.2 Leucócitos

O Gráfico 6 ilustra o número de leucócitos circulantes no sangue periférico das participantes dos grupos estudados. Os grupos C_{0a} ($5.660[4.440-7.158]/\text{mm}^3$), C_2 ($5.775[4.953-7.145]/\text{mm}^3$), C_3 ($5.760[4.543-7.033]/\text{mm}^3$), C_4 ($5.270[4.750-6.190]/\text{mm}^3$) e C_{4m} ($5.080[4.355-6.065] /\text{mm}^3$) não apresentaram diferença estatística em relação ao número de leucócitos circulantes.

Gráfico 6 - Comparação entre o número de leucócitos circulantes no sangue periférico das participantes dos grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}

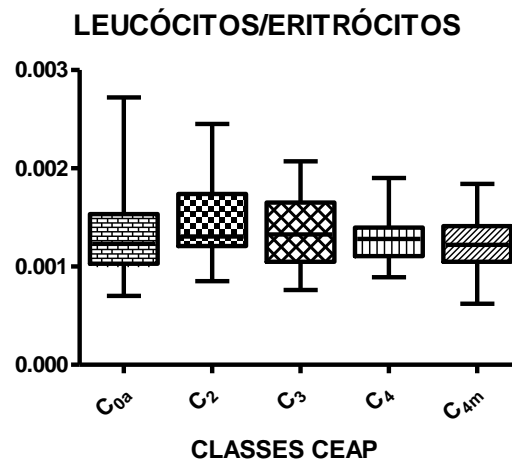


Fonte: A autora, 2013.

4.3.2 Razão leucócitos/eritrócitos

A razão leucócitos/eritrócitos no sangue periférico das participantes dos diferentes grupos estudados está representada no Gráfico 7. A razão leucócitos/eritrócitos entre os grupos C_{0a} (0,001230[0,001028-0,001533]), C₂ (0,001305[0,001208-0,001738]), C₃ (0,001325[0,001048-0,001650]), C₄ (0,001280[0,001105-0,001395]) e C_{4m} (0,001220[0,001048-0,001410]) não foi estatisticamente diferente para qualquer dos grupos estudados.

Gráfico 7 - Comparação da razão leucócitos/eritrócitos no sangue periférico entre as participantes dos grupos C_{0a} , C_2 , C_3 , C_4 e C_{4m}

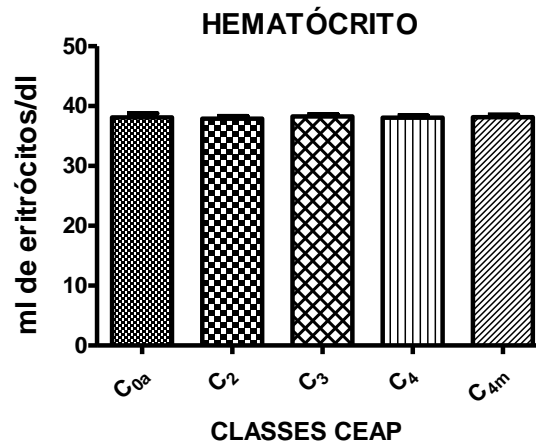


Fonte: A autora, 2013.

4.3.3 Hematócrito

O valor de hematócrito de cada grupo estudado está representado no Gráfico 8. Os valores de hematócrito obtidos em cada grupo foram: C_{0a} ($38,10 \pm 0,66$ ml de eritrócitos/dl), C_2 ($37,88 \pm 0,42$ ml de eritrócitos/dl), C_3 ($38,26 \pm 0,34$ ml de eritrócitos/dl), C_4 ($38,06 \pm 0,35$ ml de eritrócitos/dl) e C_{4m} ($38,15 \pm 0,35$ ml de eritrócitos/dl). Como os valores de hematócrito dos grupos estudados foram bem similares, não foi observada diferença estatisticamente significante entre eles.

Gráfico 8 - Comparação do valor de hematócrito entre as participantes dos grupos C_{0a} , C_2 , C_3 , C_4 e C_{4m} .

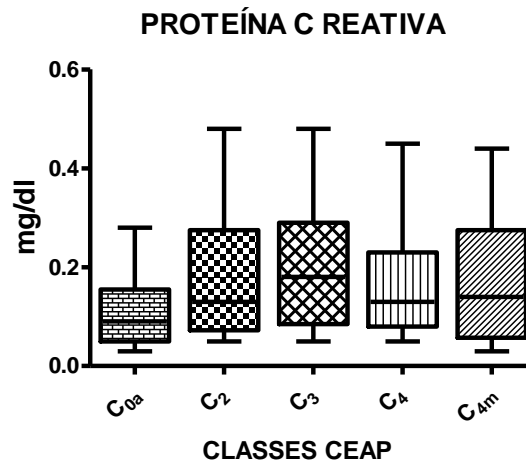


Fonte: A autora, 2013.

4.3.4 Proteína C reativa

O Gráfico 9 representa os resultados de proteína C reativa (PCR) obtidos em cada um dos grupos estudados. A diferença entre os valores de PCR no sangue periférico das participantes dos grupos C_{0a} (0,0900[0,0500-0,1550] mg/dl), C_2 (0,1300 [0,0725-0,2750] mg/dl), C_3 (0,1800[0,0850-0,2900] mg/dl), C_4 (0,1300[0,0800-0,2300] mg/dl) e C_{4m} (0,1400[0,0575-0,2750] mg/dl) não foi estatisticamente significativa.

Gráfico 9 - Comparação do valor de proteína C reativa entre as participantes dos grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}.



Fonte: A autora, 2013.

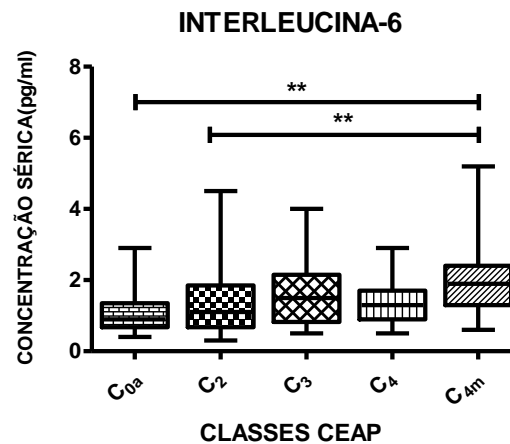
4.4 Biomarcadores

4.4.1 Biomarcador inflamatório

4.4.1.1 Interleucina-6

Os resultados da concentração sérica de Interleucina-6 (IL-6) em cada um dos grupos estudados estão representados no Gráfico 10. Os grupos C_{0a} (0,900[0,675-1,350] pg/ml) e C_{4m} (1,900[1,300-2,400] pg/ml) e C₂ (1,100[0,675-1,850] pg/ml) e C_{4m} apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Não foi observada diferença estatística entre os grupos C_{0a} vs. C₂, C_{0a} vs. C₃ (1,500[0,825-2,150] pg/ml), C_{0a} vs. C₄ (1,300[0,900-1,700] pg/ml), C₂ vs. C₃, C₂ vs. C₄, e C₃ vs. C₄.

Gráfico 10 - Comparação da concentração sérica de Interleucina-6 entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}



Nota: ** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,01$.

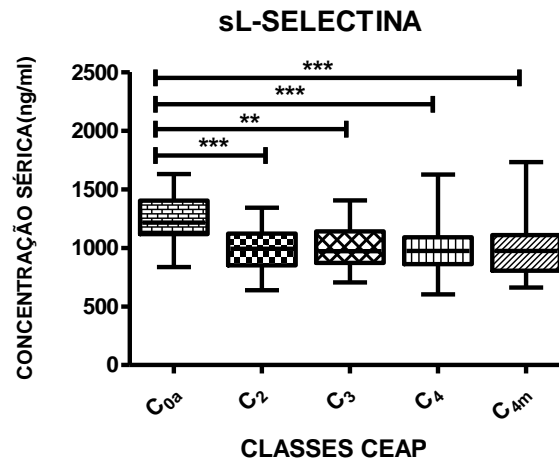
Fonte: A autora, 2013.

4.4.2 Biomarcadores de adesão celular

4.4.2.1 sL-selectina

O Gráfico 11 representa os resultados da concentração sérica de sL-selectina nos grupos estudados. As concentrações séricas de sL-selectina nos grupos C₂ (993,0 [850,3-1121,0] ng/ml), C₄ (975,0[862,5-1092,0] ng/ml) e C_{4m} (975,0[804,3-1110,0] ng/ml) foram estatisticamente menores ($p < 0,001$) em comparação ao grupo C_{0a} (1216,0[1117,0-1403,0] ng/ml). O grupo C₃ (972,5[871,3-1140,0] ng/ml) apresentou níveis circulantes de sL-selectina significativamente mais baixos ($p < 0,01$) que o grupo C_{0a}. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos C₂ vs. C₃, C₂ vs. C₄, C₂ vs. C_{4m}, C₃ vs. C₄, C₃ vs. C_{4m} e C₄ vs. C_{4m}.

Gráfico 11 - Comparação da concentração sérica de sL-selectina entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}



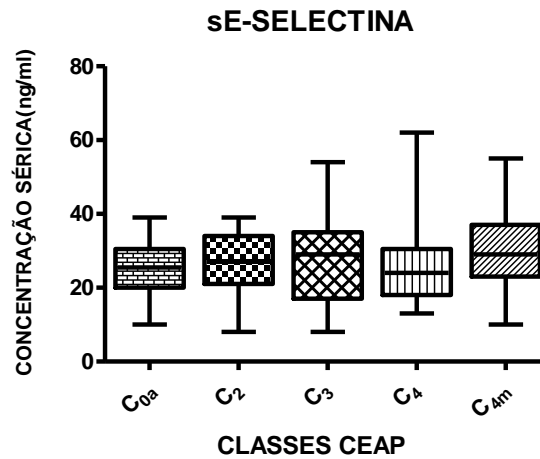
Nota: ** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,01$. *** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2013.

4.4.2.2 sE-selectina

O Gráfico 12 representa os resultados da concentração sérica de sE-selectina nos grupos estudados. As concentrações séricas de sE-selectina observadas nos grupos C_{0a} (25,50[20,00-30,50] ng/ml), C₂ (27,00 [21,00-34,00] ng/ml), C₃ (29,00[17,00-35,00] ng/ml), C₄ (24,00[18,00-30,50] ng/ml) e C_{4m} (29,00[23,00-37,00] ng/ml) não foram estatisticamente diferentes entre si.

Gráfico 12 - Comparação da concentração sérica de sE-selectina entre os grupos C_{0a} , C_2 , C_3 , C_4 e C_{4m} .

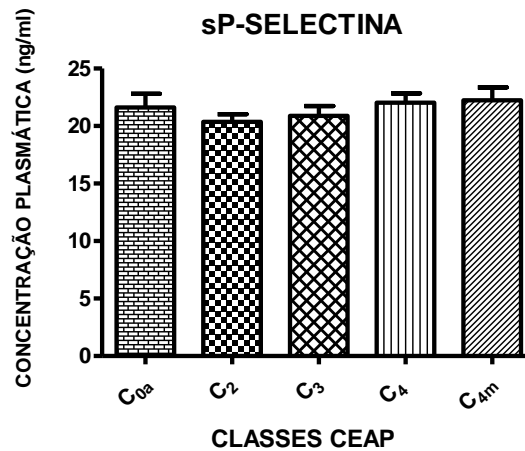


Fonte: A autora, 2013.

4.4.2.3 sP-selectina

O Gráfico 13 representa os resultados da concentração plasmática de sP-selectina nos grupos estudados. As concentrações plasmáticas de sP-selectina observadas nos grupos C_{0a} (21,610±1,194 ng/ml), C_2 (20,370±0,655 ng/ml), C_3 (20,880±0,874 ng/ml), C_4 (22,020±0,815 ng/ml) e C_{4m} (22,24±1,120 ng/ml) não foram significativamente diferentes entre si.

Gráfico 13 - Comparação da concentração plasmática de sP-selectina entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}.



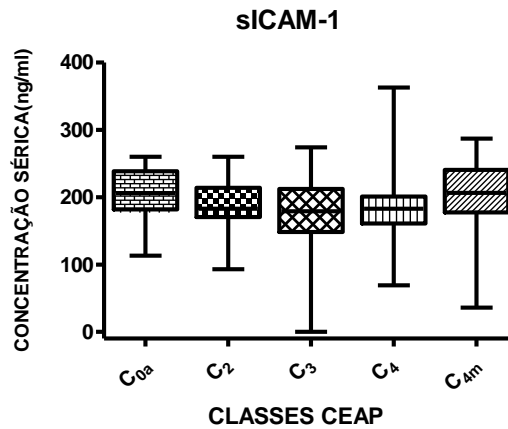
Fonte: A autora, 2013.

4.4.2.4 sICAM-1

O Gráfico 14 representa os resultados da concentração sérica de sICAM-1 nos grupos estudados. As concentrações séricas de sICAM-1 observadas nos grupos C_{0a} (206,0[181,8-238,5] ng/ml), C₂ (183,0[170,5-214,0] ng/ml), C₃ (179,0[148,3-212,3] ng/ml), C₄ (183,0[161,0-201,00] ng/ml) e C_{4m} (206,5[177,5-240,5] ng/ml) não foram significativamente diferentes entre si.

A concentração sérica de sICAM-1 de uma paciente do grupo C₃ ficou abaixo do limite de detecção do kit e ao invés de a removermos da análise estatística, atribuímos à amostra o valor do limite de sensibilidade do kit que foi de 0,0108ng/ml.

Gráfico 14 - Comparação da concentração sérica de sICAM-1 entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}.

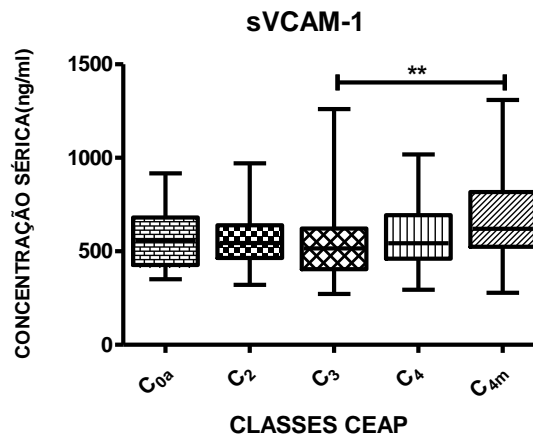


Fonte: A autora, 2013.

4.4.2.5 sVCAM-1

O Gráfico 15 representa os resultados da concentração sérica de sVCAM-1 nos grupos estudados. A concentração sérica de sVCAM-1 no grupo C₃(515,5[404,5-621,8] ng/ml) foi estatisticamente mais baixa ($p < 0,01$) do que a do grupo C_{4m} (621,0[524,5-816,3] ng/ml). As concentrações séricas de sVCAM-1 em relação aos grupos C_{0a} (557,0[427,3-680,0] ng/ml) vs. C₂ (544,5[464,8-638,8] ng/ml), C_{0a} vs. C₃, C_{0a} vs. C₄ (543,0[461,0-693,0] ng/ml), C_{0a} vs. C_{4m}, C₂ vs. C₃, C₂ vs. C_{4m}, C₃ vs. C₄ e C₄ vs. C_{4m} e C₄ vs. C_{4m} não foram estatisticamente diferentes entre si.

Gráfico 15 - Comparação da concentração sérica de sVCAM-1 entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}



Nota: ** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,01$.

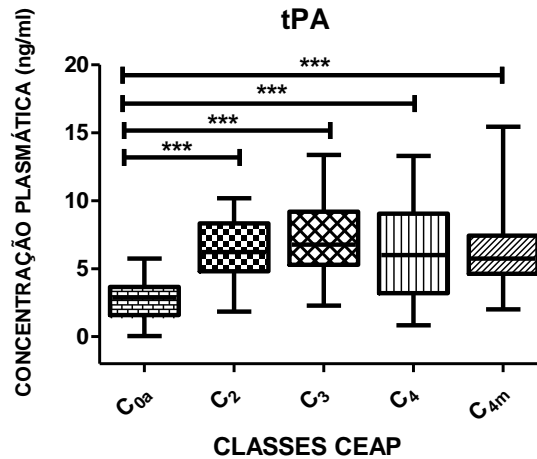
Fonte: A autora, 21013.

4.4.3 Biomarcadores de lesão endotelial

4.4.3.1 tPA

O Gráfico 16 representa os resultados da concentração plasmática de tPA nos grupos estudados. A concentração plasmática de tPA nos grupos C₂ (6,320 [4,803-8,330] ng/ml), C₃ (6,770[5,295-9,195] ng/ml), C₄ (6,000[3,200-9,040] ng/ml) e C_{4m} (5,740[4,623-7,425] ng/ml) foram estatisticamente mais elevadas ($p < 0,001$) quando comparadas ao grupo C_{0a} (2,865[1,575-3,658] ng/ml). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos C₂ vs. C₃, C₂ vs. C₄, C₂ vs. C_{4m}, C₃ vs. C₄, C₃ vs. C_{4m} e C₄ vs. C_{4m}.

Gráfico 16 - Comparação da concentração plasmática de tPA entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}



Nota: *** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,001$.

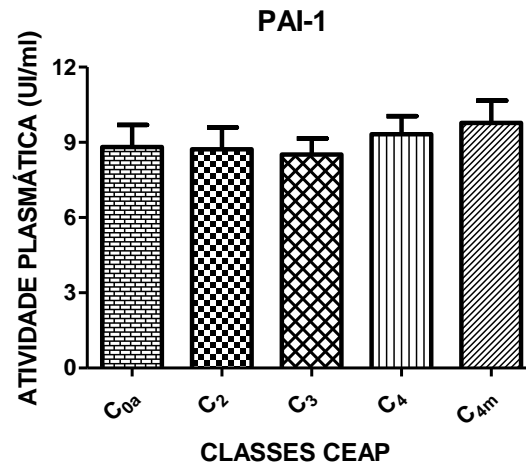
Fonte: A autora, 2013.

4.4.3.2 Atividade de PAI-1

O Gráfico 17 representa os resultados da atividade plasmática de PAI-1 nos grupos estudados. A atividade plasmática de PAI-1 nos grupos C_{0a} ($8,817 \pm 0,880$ UI/ml), C₂ ($8,728 \pm 0,866$ UI/ml), C₃ ($8,515 \pm 0,645$ UI/ml), C₄ ($9,327 \pm 0,716$ UI/ml) e C_{4m} ($9,776 \pm 0,884$ UI/ml) não foram significativamente diferentes entre si.

A atividade plasmática de algumas participantes ficaram abaixo do limite de detecção do kit e ao invés de as removermos da análise estatística, atribuímos às amostras dessas participantes o valor do limite de sensibilidade do kit que foi de $0,100$ UI/ml.

Gráfico 17 - Comparação da atividade plasmática de PAI-1 entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}

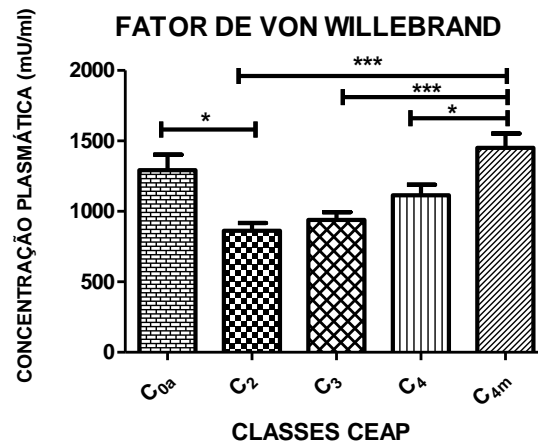


Fonte: A autora, 2013.

4.4.3.3 Fator de von Willebrand

O Gráfico 18 representa os resultados da concentração plasmática do Fator de von Willebrand (vWF) nos grupos estudados. A concentração plasmática do vWF do grupo C₂ (861,9±55,99 mU/ml) foi estatisticamente ($p < 0,05$) mais baixa do que a do grupo C_{0a} (1293±109,6 mU/ml). A concentração plasmática do grupo C₂, por sua vez, foi estatisticamente ($p < 0,001$) inferior a do grupo C_{4m} (1451±102,0 mU/ml). A concentração plasmática do grupo C₃ (938,5±54,86 mU/ml) foi estatisticamente ($p < 0,001$) menor em relação a do grupo C_{4m} a qual foi significativamente ($p < 0,05$) superior a do grupo C₄ (1114±75,98 mU/ml). As concentrações plasmáticas de vWF dos grupos C_{0a} vs. C₃, C_{0a} vs. C₄, C_{0a} vs. C_{4m} e C₂ vs. C₃, C₂ vs. C₄ e C₃ vs. C₄ não apresentaram diferenças significativas entre si.

Gráfico 18 - Comparação da concentração plasmática do Fator de von Willebrand entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}



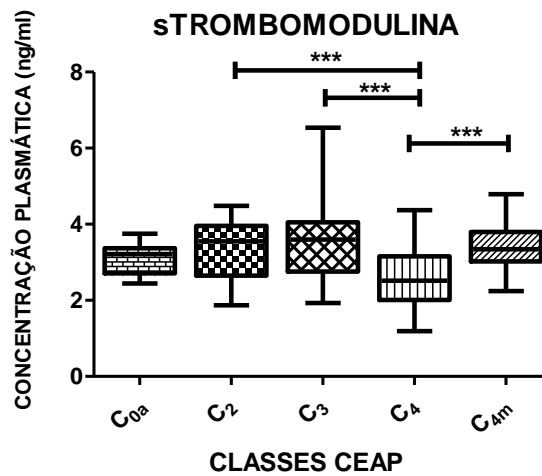
Nota: * Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,05$.
 *** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2013.

4.4.3.4 sTrombomodulina

Os resultados da concentração plasmática de sTrombomodulina (sTM) nos grupos estudados estão representados no Gráfico 19. A concentração plasmática de sTM do grupo C₂ (3,550 [2,650-3,958] ng/ml) foi estatisticamente ($p < 0,001$) superior à concentração plasmática do grupo C₄ (2,520 [2,010-3,155] ng/ml) a qual foi estatisticamente ($p < 0,001$) inferior a dos grupos C₃ (3,595 [2,760-4,053] ng/ml) e C_{4m} (3,340 [3,025-3,800] ng/ml). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos C_{0a} (3,215 [2,710-3,370] ng/ml) vs. C₂, C_{0a} vs. C₃, C_{0a} vs. C₄, C_{0a} vs. C_{4m}, C₂ vs. C₃, C₂ vs. C_{4m} e C₃ vs. C_{4m}.

Gráfico 19 - Comparação da concentração plasmática de sTrombomodulina entre os grupos C_{0a} , C_2 , C_3 , C_4 e C_{4m}



Nota: *** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,001$.

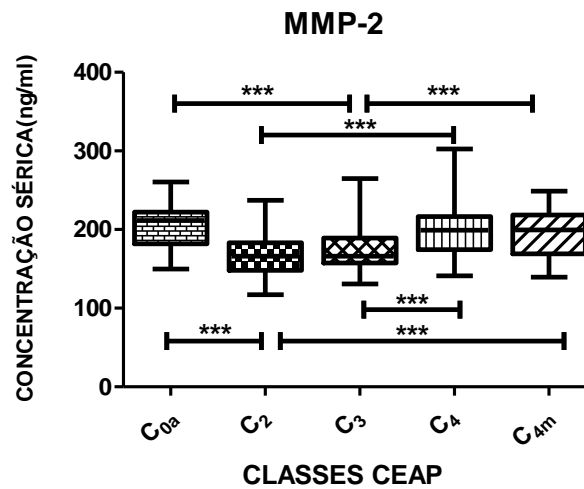
Fonte: A autora, 2013.

4.4.4 Biomarcadores de remodelamento tecidual

4.4.4.1 MMP-2

Os resultados da concentração sérica de MMP-2 estão representados no Gráfico 20. Os grupos C_2 (166,2[148,3-183,1] ng/ml) e C_3 (166,1[157,5-189,1] ng/ml) apresentaram concentração sérica de MMP-2 significativamente ($p < 0,001$) menores em relação ao grupo C_{0a} (211,0[181,9-222,2] ng/ml). A concentração sérica de MMP-2 do grupo C_2 foi estatisticamente ($p < 0,001$) menor do que a dos grupos C_4 (199,1[174,4-216,4] ng/ml) e C_{4m} (199,7[169,2-218,5] ng/ml). A concentração sérica de MMP-2 do grupo C_3 também foi significativamente ($p < 0,001$) inferior a dos grupos C_4 e C_{4m} . Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos C_{0a} vs. C_4 , C_{0a} vs. C_{4m} , C_2 vs. C_3 e C_4 vs. C_{4m} .

Gráfico 20 - Comparação da concentração sérica de MMP-2 entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}



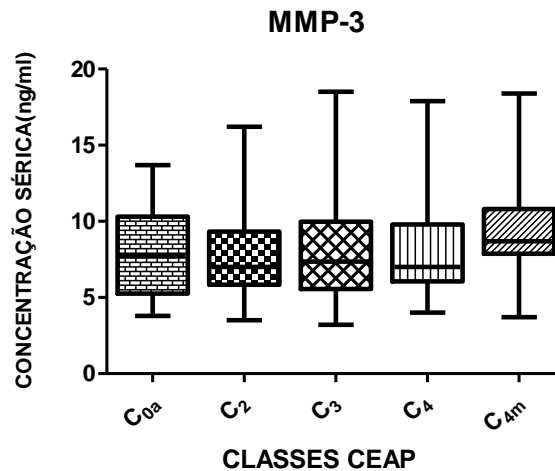
Nota: *** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2013.

4.4.2.2 MMP-3

Os resultados da concentração sérica de MMP-3 nos grupos estudados estão representados no Gráfico 21. As concentrações séricas de MMP-3 observada nos grupos C_{0a} (7,700[5,250-10,30] ng/ml), C₂ (7,000[5,850-9,325] ng/ml), C₃ (7,350[5,550-9,975] ng/ml), C₄ (7,000[6,050-9,800] ng/ml) e C_{4m} (8,700[7,875-10,80] ng/ml) não foram significativamente diferentes entre si.

Gráfico 21- Comparação da concentração sérica de MMP-3 entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}

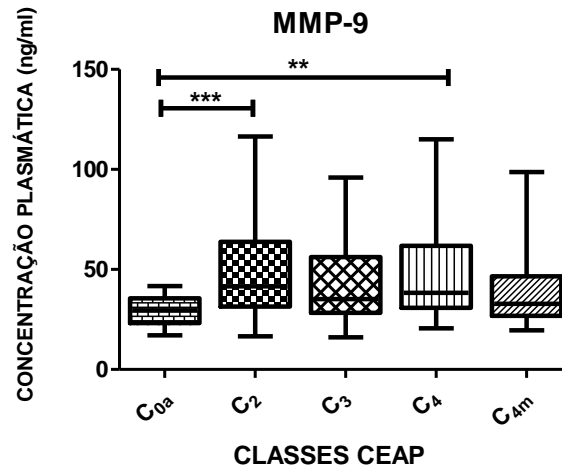


Fonte: A autora, 2013.

4.4.4.3 MMP-9

Os resultados da concentração plasmática de MMP-9 estão representados no Gráfico 22. O grupo C₂ (41,55[31,38-63,83] ng/ml) apresentou concentração plasmática de MMP-9 significativamente ($p < 0,001$) maior do que a do grupo C_{0a} (29,55[23,15-35,60] ng/ml). O grupo C₄ (38,30[30,75-61,80] ng/ml) apresentou níveis plasmáticos estatisticamente ($p < 0,01$) superiores aos do grupo C_{0a}. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos C_{0a} vs. C₃ (35,20[28,35-56,23] ng/ml), C_{0a} vs. C_{4m} (32,80[26,78-46,53] ng/ml), C₂ vs. C₃, C₂ vs. C₄, C₂ vs. C_{4m}, C₃ vs. C₄, C₃ vs. C_{4m} e C₄ vs. C_{4m}.

Gráfico 22 - Comparação da concentração plasmática de MMP-9 entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}



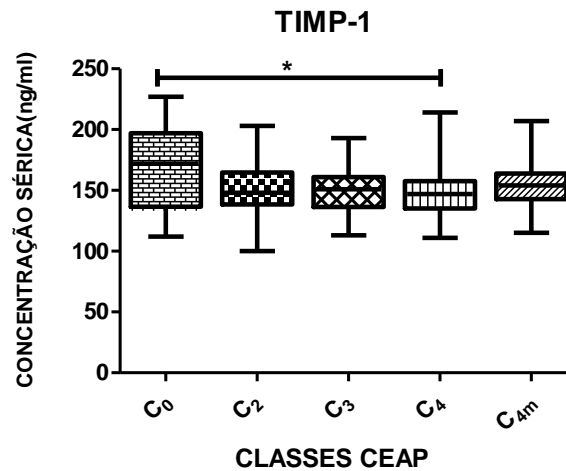
Nota: **Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,01$.
 *** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2013.

4.4.4.4 TIMP-1

Os resultados da concentração sérica de TIMP-1 estão representados no Gráfico 23. O grupo C₄ (147,0[135,0-157,5] ng/ml) apresentou concentração sérica de TIMP-1 significativamente ($p < 0,05$) menor do que a do grupo C_{0a} (172,0[136,5-197,0] ng/ml). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos C_{0a} vs. C₂ (148,0[138,5-164,8] ng/ml) C_{0a} vs. C₃ (151,0[136,3-161,0] ng/ml), C_{0a} vs. C_{4m} (154,0[142,8-163,8] ng/ml), C₂ vs. C₃, C₂ vs. C₄, C₂ vs. C_{4m}, C₃ vs. C₄, C₃ vs. C_{4m} e C₄ vs. C_{4m}.

Gráfico 23 - Comparação da concentração sérica de TIMP-1 entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}.

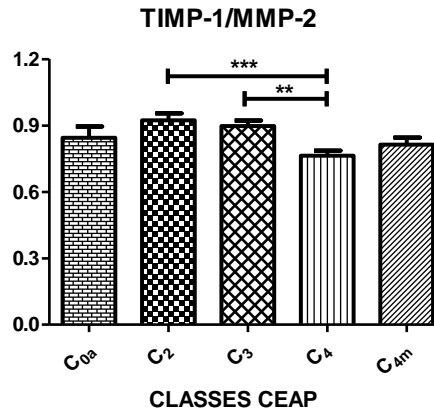


Nota: *Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,05$.

Fonte: A autora, 2013.

4.4.4.5 Razão TIMP-1/MMP-2

Os resultados da razão TIMP-1/MMP-2 estão representados na Gráfico 24. O grupo C₄ ($0,7634 \pm 0,0222$) apresentou razão TIMP-1/MMP-2 significativamente ($p < 0,001$) menor do que a do grupo C₂ ($0,9239 \pm 0,0302$) e estatisticamente inferior ($p < 0,01$) a do grupo C₃ ($0,8979 \pm 0,0242$). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos C_{0a} ($0,8444 \pm 0,0506$) vs. C₂, C_{0a} vs. C₃, C_{0a} vs. C₄, C_{0a} vs. C_{4m} ($0,8132 \pm 0,0327$), C₂ vs. C₃, C₃ vs. C_{4m} e C₄ vs. C_{4m}.

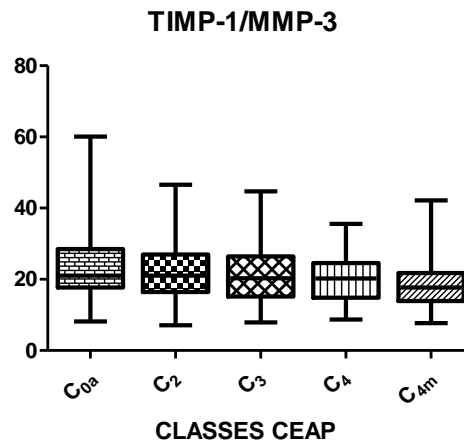
Gráfico 24 - Comparação da razão TIMP-1/MMP-2 entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}.

Nota: **Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,01$.
 ***Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2013.

4.4.4.6 Razão TIMP-1/MMP-3

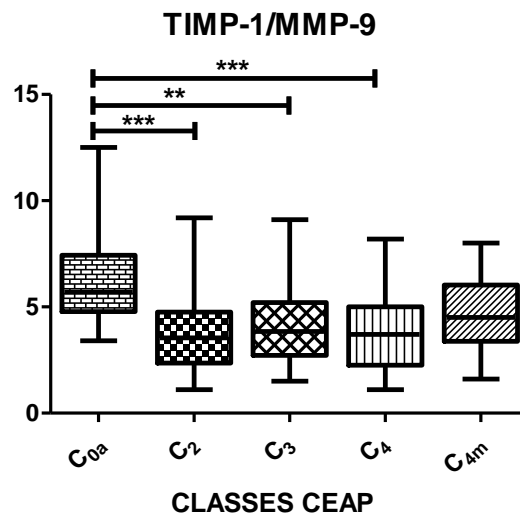
Os resultados da razão TIMP-1/MMP-3 nos grupos estudados estão representados no Gráfico 25. A razão TIMP-1/MMP-3 observada nos grupos C_{0a} (21,05[17,70-28,50]), C₂ (21,00[16,43-26,95]), C₃ (20,30[15,20-26,45]), C₄ (20,20[14,85-24,55]) e C_{4m} (17,71[13,93-21,78]) não foram significativamente diferentes entre si.

Gráfico 25 - Comparação da razão TIMP-1/MMP-3 entre os grupos C_{0a} , C_2 , C_3 , C_4 e C_{4m} 

Fonte: A autora, 2013.

4.4.4.7 Razão TIMP-1/MMP-9

Os resultados da razão TIMP-1/MMP-9 nos grupos estudados estão representados no Gráfico 26. A razão TIMP-1/MMP-9 nos grupos C_2 (3,555[2,350-4,750]) e C_4 (3,700[2,250-5,000]) foram significativamente ($p < 0,001$) menores do que a do grupo C_{0a} (5,700[4,775-7,425]). A razão TIMP-1/MMP-9 no grupo C_3 (3,850[2,750-5,200]) foi estatisticamente ($p < 0,01$) inferior a do grupo C_{0a} . Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos C_{0a} vs. C_{4m} (4,500[3,375-6,025]), C_2 vs. C_3 , C_2 vs. C_4 , C_2 vs. C_{4m} , C_3 vs. C_4 , C_3 vs. C_{4m} e C_4 vs. C_{4m} .

Gráfico 26 - Comparação da razão TIMP-1/MMP-9 entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}

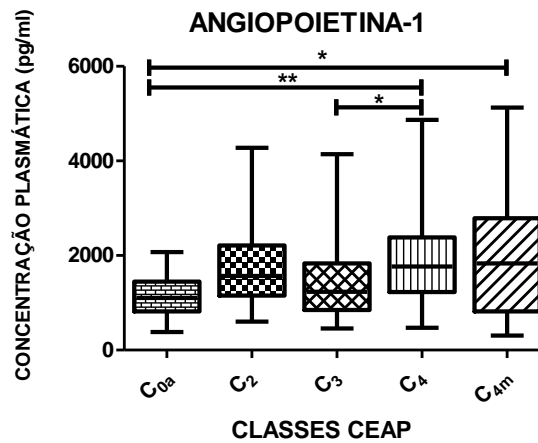
Fonte: A autora, 2013.

4.4.5 Biomarcadores de remodelamento vascular

4.4.5.1 Angiopietina-1

Os resultados da concentração plasmática de Angiopietina-1 estão representados no Gráfico 27. O grupo C₄ (1766[1226-2380] pg/ml) apresentou concentração plasmática de Angiopietina-1 significativamente ($p < 0,01$) maior do que a do grupo C_{0a} (1101[818,0-1448] pg/ml). O grupo C_{4m} (1831[817,5-2787] pg/ml) apresentou níveis plasmáticos estatisticamente ($p < 0,05$) superiores aos grupo C_{0a}. A concentração plasmática de Angiopietina-1 no grupo C₃ (1231[849,5-1835] pg/ml) também foi significativamente ($p < 0,05$) menor do que a do grupo C₄. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos C_{0a} vs. C₂ (1569[1155-2214] pg/ml), C_{0a} vs. C₃, C₂ vs. C₃, C₂ vs. C₄, C₂ vs. C_{4m}, C₃ vs. C_{4m} e C₄ vs. C_{4m}.

Gráfico 27 - Comparação da concentração plasmática de Angiotensina-1 entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}.



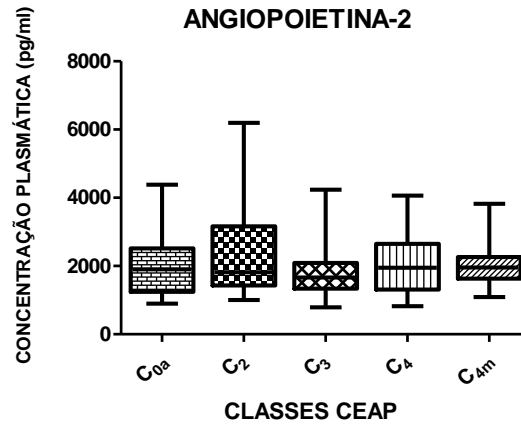
Nota: *Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,05$. ** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,01$.

Fonte: A autora, 2013.

4.4.5.2 Angiotensina-2

Os resultados da concentração plasmática de Angiotensina-2 nos grupos estudados estão representados no Gráfico 28. As concentrações plasmáticas de Angiotensina-2 observada nos grupos C_{0a} (1903[1241-2517] pg/ml), C₂ (1815[1433-3160] pg/ml), C₃ (1663[1338-2093] pg/ml), C₄ (1,953[1313-2649] pg/ml) e C_{4m} (1956 [1629-2260] pg/ml) não foram significativamente diferentes entre si.

Gráfico 28 - Comparação da concentração plasmática de Angiopietina-2 entre os grupos C_{0a} , C_2 , C_3 , C_4 e C_{4m}

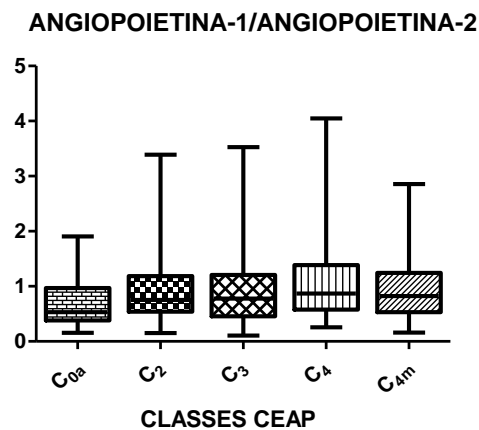


Fonte: A autora, 2013.

4.4.5.3 Razão Angiopietina-1/Angiopietina-2

Os resultados da razão Angiopietina-1/Angiopietina-2 nos grupos estudados estão representados no Gráfico 29. A razão Angiopietina-1/Angiopietina-2 observada nos grupos C_{0a} (0,533[0,380-0,968]), C_2 (0,754[0,541-1,186]), C_3 (0,778[0,456-1,206]), C_4 (0,869[0,577-1,384]) e C_{4m} (0,823 [0,531-1,243]) não foram significativamente diferentes entre si.

Gráfico 29 - Comparação da razão Angiopietina-1/Angiopietina-2 entre os grupos C_{0a} , C_2 , C_3 , C_4 e C_{4m} .

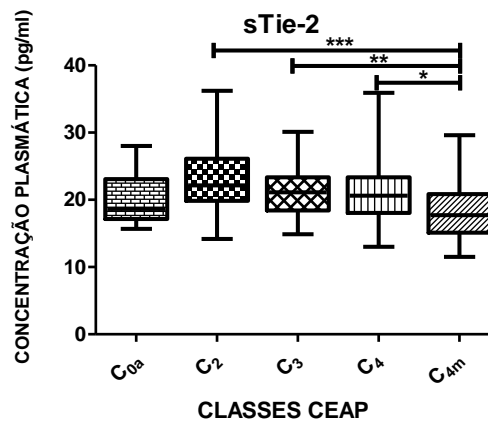


Fonte: A autora, 2013.

4.4.5.4 sTie-2

Os resultados da concentração plasmática de sTie-2 estão representados no Gráfico 30. O grupo C_{4m} (17,70[15,13-20,85] pg/ml) apresentou concentração plasmática de sTie-2 significativamente ($p<0,001$) menor do que a do grupo C_2 (22,15[19,85-26,13] pg/ml), estatisticamente ($p<0,01$) inferior a do grupo C_3 (21,10[18,43-23,35] pg/ml) e significativamente ($p<0,05$) mais baixa do que a do grupo C_4 (20,60[18,05-23,35] pg/ml). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos C_{0a} (18,65[17,15-23,08] pg/ml) vs. C_2 , C_{0a} vs. C_3 , C_{0a} vs. C_4 , C_{0a} vs. C_{4m} , C_2 vs. C_3 , C_2 vs. C_4 e C_3 vs. C_4 .

Gráfico 30 - Comparação da concentração plasmática de sTie-2 entre os grupos C_{0a} , C_2 , C_3 , C_4 e C_{4m}



Nota: *Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p<0,05$. ** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p<0,01$ ***Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p<0,001$.

Fonte: A autora, 2013

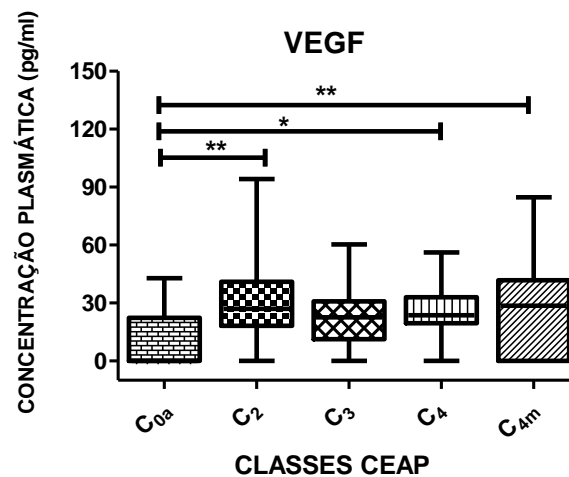
4.4.5.5 VEGF

Os resultados da concentração plasmática de VEGF estão representados no Gráfico 31. Os grupos C_2 (27,05 [18,18-41,00] pg/ml) e C_{4m} (28,55[0,0292-41,80] pg/ml) apresentaram concentrações plasmáticas de VEGF significativamente ($p<0,01$) maiores do que a do grupo

C_{0a} (0,0292[0,292-22,30] pg/ml). O grupo C_4 (23,70[19,55-33,00] pg/ml) apresentou níveis circulantes de VEGF estatisticamente ($p < 0,05$) superiores aos do grupo C_{0a} . Os grupos C_{0a} vs. C_3 (22,65[11,23-30,90] pg/ml), C_2 vs. C_3 , C_2 vs. C_4 , C_2 vs. C_{4m} , C_3 vs. C_4 , C_3 vs. C_{4m} e C_4 vs. C_{4m} não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

A concentração de VEGF no plasma de algumas participantes ficou abaixo do limite de detecção do kit e ao invés de as removermos da análise estatística, atribuímos às amostras dessas participantes o valor do limite de sensibilidade do kit que foi de 0,0292 pg/ml.

Gráfico 31 - Comparação da concentração plasmática de VEGF entre os grupos C_{0a} , C_2 , C_3 , C_4 e C_{4m}



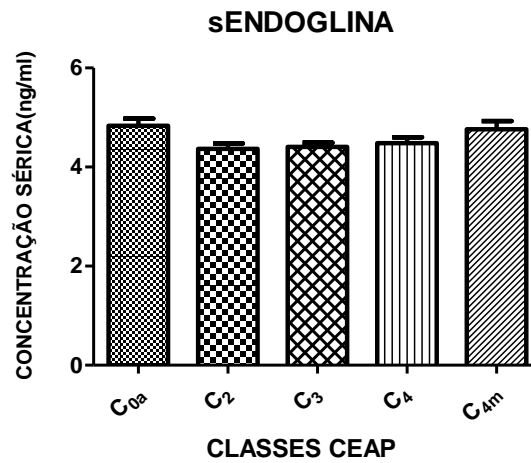
Nota: *Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,05$. ** Representa diferença estatisticamente significativa entre grupos ao nível de $p < 0,01$.

Fonte: A autora, 2013.

4.4.5.6 sEndogлина

O Gráfico 32 representa os resultados da concentração sérica de sEndogлина nos grupos estudados. As concentrações séricas de sEndogлина observada nos grupos C_{0a} (4,833±0,145 ng/ml), C_2 (4,368±0,107 ng/ml), C_3 (4,407±0,085 ng/ml), C_4 (4,484±0,117 ng/ml) e C_{4m} (4,763±0,163 ng/ml) não foram significativamente diferentes entre si.

Gráfico 32 - Comparação da concentração sérica de sEndoglina entre os grupos C_{0a}, C₂, C₃, C₄ e C_{4m}



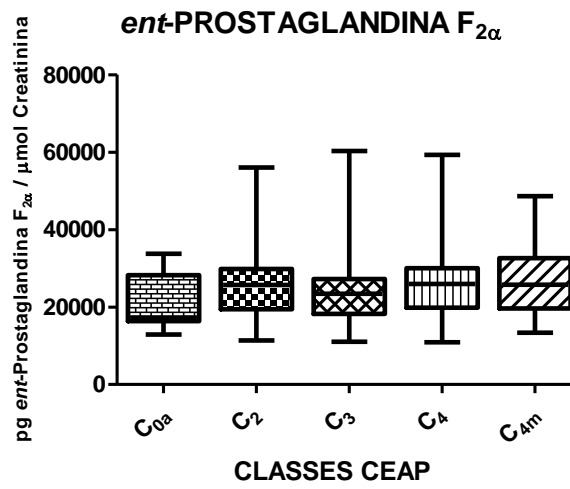
Fonte: A autora, 2013.

4.4.6 Biomarcador de estresse oxidativo

4.4.6.1 *ent*-Prostaglandina F_{2α}

O Gráfico 33 representa os resultados da concentração urinária de *ent*-Prostaglandina F_{2α} (ent-PGF_{2α}) nos grupos estudados. As concentrações urinárias de ent-PGF_{2α} observadas nos grupos C_{0a} (17272[16358-28219] pg de ent-PGF_{2α}/μmol de creatinina), C₂ (25721[19413-29847] pg de ent-PGF_{2α}/μmol de creatinina), C₃ (23407[18245-27228] pg de ent-PGF_{2α}/μmol de creatinina), C₄ (25976[19827-30035] pg de ent-PGF_{2α}/μmol de creatinina) e C_{4m} (25761[19667-32643] pg de ent-PGF_{2α}/μmol de creatinina) não foram significativamente diferentes entre si.

Gráfico 33- Comparação da concentração urinária de *ent*-Prostaglandina $F_{2\alpha}$ entre os grupos C_{0a} , C_2 , C_3 , C_4 e C_{4m}



Fonte: A autora, 2013.

5 DISCUSSÃO

Apesar de haver diferenças de IMC em relação aos grupos é importante ressaltar que nenhuma participante estudada possuía IMC inferior ou igual a 18 ou superior ou igual a 30 que são critérios para diagnóstico de desnutrição e obesidade, respectivamente que poderiam interferir na interpretação dos resultados.

Com relação à idade, todas as participantes se encontravam dentro dos limites estabelecidos para cada grupo e foram observadas diferenças estatísticas entre praticamente todos os grupos, com exceção dos grupos C_3 vs. C_4 . Propositadamente as faixas etárias estabelecidas para os grupos C_{0a} , C_2 , C_3 e C_4 e C_{4m} foram diferentes, pois sabemos que a doença se torna mais severa com o avanço da idade (Musil et al., 2011) e que, em outras palavras, não poderíamos encontrar uma C_{0a} na mesma faixa etária de uma C_4 ou C_{4m} e vice-versa. Concluímos que apesar de ser um fator de confundimento, a idade não poderia deixar de ser considerada nas análises estatísticas constituindo, assim, uma das limitações de nosso estudo.

Um estudo demonstrou que, após submeter indivíduos saudáveis à hipertensão venosa experimental, havia redução do número de leucócitos que deixavam a circulação dos pés (Moyses et al., 1987). Um ano mais tarde, foi observado que havia uma redução do número de leucócitos que deixavam os pés de pacientes com DVC e foi concluído que os leucócitos haviam sido aprisionados na circulação dos membros inferiores (Thomas et al., 1988a). No mesmo ano, através da observação da pele de pacientes com DVC, com auxílio de um microscópio, foi o reportado que existia diminuição do número de capilares perfundidos após os pacientes serem submetidos à hipertensão venosa, sugerindo que o aumento da pressão venosa reduz a pressão de perfusão capilar (Coleridge-Smith et al., 1988). Com base nessas observações, foi postulada a hipótese do aprisionamento de leucócitos (Coleridge-Smith et al., 1988). Essa hipótese também propõe que o aumento da pressão venosa reduz o fluxo sanguíneo na microcirculação o que leva, por conseguinte, à marginação, ativação, adesão e transmigração de leucócitos. Uma vez ativados, os leucócitos liberam enzimas proteolíticas e ROS que resultam em lesão tecidual. Em um estudo foi mostrado que, após a hipertensão venosa, pacientes com veias varicosas e lipodermatosclerose apresentavam redução da razão leucócitos/eritrócitos no sangue coletado da veia safena magna ou da veia dorsal do pé, corroborando a hipótese do aprisionamento de leucócitos na microcirculação dos membros

inferiores (Saharay et al., 1997). Em outro estudo, foi reportado queda significativa do número de leucócitos presentes no sangue removido de uma das veias do pé de pacientes com DVC após hipertensão venosa experimental, o que também corrobora a hipótese do aprisionamento de leucócitos (Khodabandehlou et al., 2004). No presente estudo, apesar de não submetemos as participantes à hipertensão venosa experimental e de não coletarmos sangue de veias superficiais da perna, tentamos observar se havia declínio do número de leucócitos e diminuição da razão leucócitos/eritrócitos na circulação periférica nos diferentes estágios clínicos da doença e constatamos que houve diminuição gradativa, não significativa, do número de leucócitos circulantes do grupo C₂ ao grupo C_{4m} e também redução, sem significância estatística, da razão leucócitos/eritrócitos do grupo C₃ ao grupo C_{4m}. Com base nesses resultados não podemos inferir que houve aprisionamento de leucócitos na microcirculação de membros inferiores das pacientes de nosso estudo.

Como consequência da hipertensão venosa, ocorre o extravasamento de macromoléculas para o interstício (Thomas et al., 1988b). O extravasamento plasmático ocasiona sobrecarga linfática, edema e aumenta a viscosidade sanguínea (Boisseau e de La Giclais, 2004). Em um estudo envolvendo amostras de sangue removidas de uma das veias do pé de controles e pacientes com DVC foi observado que, em condições basais, o número de eritrócitos e o valor de hematócrito em pacientes DVC são menores (sem significância estatística) em relação ao grupo controle, sugerindo que a hemoconcentração não é um fator característico da DVC (Khodabandehlou et al., 2004). Em nosso estudo observamos que o número de eritrócitos e o valor de hematócrito, em todos os grupos, foram muito similares e, portanto, não houve diferença estatística entre os mesmos corroborando com esses dados da literatura.

Os monócitos/macrófagos que se acumulam nas válvulas venosas e parede vascular liberam IL-6 (Sprague e Khalil, 2009) uma citocina pró-inflamatória que possui um papel, fundamental na potencialização da resposta inflamatória (Yasim et al., 2008) induzindo a secreção de Interleucina-8 (IL-8), de proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1) e a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais (Gabay, 2006). Em nosso estudo constatamos que pacientes com quadro de DVC mais avançado, ou seja, pacientes C_{4m}, apresentavam aumento significativo ($p < 0,01$) dos níveis séricos de IL-6 em relação aos grupos C_{0a} e C₂. Em um estudo, foi observado que os níveis séricos de IL-6 em 11 pacientes homens com úlcera de estase venosa eram significativamente maiores do que aqueles apresentados pelos 11 controles pareados por gênero e idade (Pappas et al., 1995). Em outro

estudo, foi avaliada a concentração de IL-6 no plasma proveniente da veia braquial de 25 controles e de 25 pacientes com estágio clínico C₂ de DVC primária (Yasim et al., 2008). Ambos os grupos eram compostos por homens e mulheres e não foi observada diferença estatística entre o grupo controle e o grupo C₂, corroborando nossos dados.

Os mecanismos moleculares envolvidos na ativação e adesão de leucócitos na DVC envolve a interação de moléculas de adesão presentes na superfície de membrana de leucócitos circulantes e das células endoteliais. Essas moléculas são responsáveis pelo rolamento, adesão e transmigração ao longo do endotélio das vênulas pós-capilares e são divididas em três classes: as selectinas, integrinas e membros da superfamília das imunoglobulinas. Em nosso estudo avaliamos as concentrações sanguíneas das formas solúveis da família das selectinas e de membros da superfamília de imunoglobulinas. A família das selectinas promove o rolamento dos leucócitos ao longo do endotélio das vênulas pós-capilares e incluem a L-selectina, constitutivamente expressa na superfície dos leucócitos, a E-selectina, expressa pelo endotélio ativado e a P-selectina, expressa pelo endotélio e plaquetas ativadas. Avaliamos também a concentração sérica das formas solúveis de ICAM-1 e de VCAM-1 em nosso estudo. ICAM-1 e VCAM-1 são membros da superfamília das imunoglobulinas e são ligantes endoteliais para as integrinas presentes na superfície de leucócitos e plaquetas. A interação entre essas duas classes de moléculas de adesão permite a firme adesão de leucócitos e plaquetas ao endotélio.

Uma vez ativados, os leucócitos liberam a sL-selectina através de um fenômeno denominado *shedding* e passam a expressar a integrina CD11b que permite a firme adesão de leucócitos ao endotélio e subsequente degranulação e transmigração (Jutila, 1994; Saharay *et al.*, 1997). O número de moléculas de CD11b expressas na superfície leucocitária é dependente do estado de ativação do leucócito (Saharay et al., 1997).

Com agravamento da DVC e o conseqüente aumento do processo inflamatório, supúnhamos que houvesse uma elevação dos níveis circulantes de sL-selectina nos grupos C₂, C₃, C₄ e C_{4m} em relação ao grupo C_{0a}. Contrariamente ao esperado, observamos diminuição significativa da concentração sérica de sL-selectina dos grupos C₂, C₃, C₄ e C_{4m} em comparação ao grupo C_{0a}. Nossos resultados corroboram os resultados encontrados em outro estudo (Saharay et al., 1997) no qual foi constatado aumento da concentração de sL-selectina em amostras de plasma (obtidas por punção em uma das veias do pé) nos voluntários sadios, em relação aquelas encontradas nos pacientes com varizes e com lipodermatosclerose. Posteriormente, outro estudo (Jünger et al., 2000) mostrou que, após submeter controles

saudáveis à hipertensão venosa experimental, houve redução significativa na expressão de sL-selectina e não na expressão de L-selectina na superfície de leucócitos nos pacientes com ulcera venosa, sugerindo que pacientes com DVC apresentam um defeito específico no processo de *shedding*.

A forma circulante de E-selectina (sE-selectina) pode ser liberada por clivagem enzimática ou por *shedding* de células endoteliais ativadas ou danificadas (Pigott et al., 1992; Constans e Conri, 2006). Em nosso estudo não foi observado nenhuma diferença estatística na concentração sérica de sE-selectina entre os grupos. No entanto, em outro estudo (Saharay et al., 1998) foi constatado aumento significativo de sE-selectina em amostras de plasma provenientes dos membros inferiores de pacientes com lipodermatosclerose, em relação às amostras dos controles e de pacientes com veias varicosas.

A P-selectina nas células endoteliais é armazenada nos corpos Weibel-Palade e em plaquetas, nos grânulos- α . Após a ativação das plaquetas, a P-selectina presente nos grânulos- α é prontamente translocada para superfície da membrana onde é rapidamente liberada por *shedding*. As sP-selectinas liberadas por *shedding* das plaquetas constituem a principal fonte da forma solúvel de P-selectina encontrada no plasma solúvel (Dunlop et al., 1992; Michelson et al., 1996). A P-selectina translocada para a membrana das células endoteliais ativadas é reciclada pela célula, porém é possível que uma parte da sP-selectina presente no plasma seja de origem endotelial (Burger e Wagner, 2003). Ambas as formas solúvel ou de membrana da P-selectina são agonistas de processos trombóticos e inflamatórios. As plaquetas ativadas são incorporadas ao trombo e a P-selectina expressa em suas superfícies auxilia no recrutamento de leucócitos para o local da lesão (André, 2004). Além disso, a P-selectina é capaz de induzir a expressão do fator tecidual em monócitos e de promover a ligação das plaquetas aos monócitos e aos neutrófilos (Celi et al., 1994). A concentração plasmática de sP-selectina não variou significativamente entre os grupos. Outro estudo (Lu et al., 2006) também não reportou diferença na concentração sérica de sP-selectina entre o grupo controle e o de pacientes (classes clínicas CEAP variando de C₃ a C₆). Nesse estudo, o sangue foi coletado da veia safena magna na região do tornozelo e ambos os grupos eram compostos por homens e mulheres. É possível que nossas pacientes não tenham níveis elevados de sP-selectina em relação às controles por apresentarem DVC primária, ou seja, não decorrente de um episódio de trombose venosa profunda (TVP). Alguns estudos correlacionam a incidência de TVP a altos níveis circulantes de sP-selectina (Blann et al., 2000; Kyrle et al., 2007; Rectenwald et al., 2005). Um estudo caso-controle realizado na população de San Diego mostrou que níveis

significativamente mais altos de sP-selectina plasmática estão relacionados aos casos de DVC mais graves, que podem ser ocasionados pela síndrome pós-flebítica caracterizada por obstrução venosa e incompetência valvular, e que ocorre após 50% dos casos de TVP (Bryan et al., 2012).

ICAM-1 é expressa de maneira constitutiva induzida, principalmente, na superfície das células endoteliais e serve como contra-receptor para a integrina CD11a/CD18. A interação entre ICAM-1 e CD11a/CD18 facilita a adesão e a migração de leucócitos ao longo do endotélio (Witkowska e Borawska, 2004, Contans e Conri 2006). Entretanto, a ligação entre sICAM-1 e CD11a/CD18 é capaz de inibir a adesão de linfócitos à superfície endotelial (Rieckmann et al., 1995). ICAM-1 e sua forma circulante estão envolvidas na fisiopatologia de inúmeras doenças inflamatórias (Witkowska e Borawska, 2004) e neoplasias (Banks et al., 1993). A liberação de sICAM-1 é induzida por interferon- γ (IFN- γ), TNF- α , IL-1 e IL-6 (Witkowska e Borawska, 2004). O mecanismo que permite a liberação de sICAM-1 não está completamente elucidado. Estudos *in vitro* mostraram que sICAM-1 simplesmente reflete a expressão endotelial de ICAM-1 nessas células (Leeuwenberg et al., 1992). sICAM-1 pode ser gerada através de *shedding*, via clivagem proteolítica por elastase de neutrófilos (Champagne et al., 1998) e MMPs (Lyons et al., 1998). Entretanto, outro estudo reporta a existência de mRNAs específicos que codificam a sICAM-1 (Wakatsuki et al., 1995). Em nosso estudo não houve variação da concentração sérica de sICAM entre os grupos estudados. Em outro estudo (Saharay et al., 1998) foi relatado aumento significativo da sICAM-1 em amostras plasma provenientes de veia de membros inferiores dos pacientes com varizes e com lipodermatosclerose, em relação aos controles.

VCAM-1, assim como ICAM-1, se assemelha estruturalmente às imunoglobulinas e é expressa nas células endoteliais em resposta a citocinas, e promove a firme adesão de leucócitos ao endotélio, via interação à integrina CD49d/CD29, expressa em monócitos e linfócitos (Saharay et al., 1998; Constans e Conri, 2006). A forma solúvel de VCAM-1 (sVCAM-1) é liberada no sangue por *shedding* (Jacob et al., 2002). Em nosso estudo observamos aumento significativo da concentração sérica de sVCAM-1 somente em relação ao grupos C₃ e C_{4m}. Em outro estudo (Saharay et al., 1998) foi constatado aumento significativo na concentração plasmática de sVCAM-1 de pacientes com veias varicosas e com lipodermatosclerose em relação aos controles. No entanto, este estudo não avaliou a diferença estatística entre os dois grupos de pacientes para, poder ser comparado com nossos resultados.

É importante ressaltar que podemos não ter encontrado diferenças estatísticas nas concentrações das moléculas de adesão circulantes nos diferentes estágios clínicos da DVC porque, possivelmente, os níveis dessas moléculas encontrados no sangue correspondam apenas a uma proporção do total que foi liberado por *shedding* na circulação. É provável que uma parte dessas moléculas de adesão circulantes tenha se ligado a seus contra-receptores, diminuindo seus níveis circulantes (Gearing e Newman, 1993).

A cessação do fluxo sanguíneo e a estase venosa com baixa força de cisalhamento causa hiperviscosidade sanguínea e hipóxia relativa. A hipóxia leva à diminuição de pH e, consequente, ativação de leucócitos (Pascarella et al., 2005; Yasim et al., 2008). Os leucócitos ativados secretam metabólitos tóxicos, enzimas proteolíticas e ROS (Coleridge-Smith, 2001; Hollingsworth et al., 2001; Glowinsky e Glowinsky 2002; Jacob et al., 2002; Howlader e Coleridge-Smith, 2003). Esses mediadores têm efeitos tóxicos sobre a parede vascular e os tecidos circunjacentes com consequente aumento da permeabilidade capilar e destruição progressiva de tecidos e células. Com a lesão das células endoteliais, há aumento da tendência à trombogenicidade (Yasim et al., 2008). Nessas condições há baixa biodisponibilidade de fatores protetores do endotélio como o NO, PGI₂ e EDHF, TM e tPA que promovem vasodilatação, fibrinólise, inibição da agregação plaquetária e coagulação, concomitantemente ao aumento dos níveis de vasoconstrictores como a endotelina-1, angiotensina II, PAI-1 e vWF (Constans e Conri, 2006).

A fibrinólise é o mecanismo fisiológico capaz de remover os trombos intravasculares permitindo a livre passagem de sangue nos vasos sanguíneos. (Wu e Zhao, 2002). Após a formação do coágulo no vaso lesionado, o sistema fibrinolítico degrada o coágulo de fibrina, restaurando o fluxo sanguíneo em órgãos vitais e tecidos. O sistema fibrinolítico é constituído pelas proteínas uroquinase-ativador de plasminogênio (uPA), tPA e plasminogênio. Essas proteínas formam uma cascata enzimática na qual uPA e tPA convertem plasminogênio em plasmina, que por sua vez, degrada a fibrina (Collen e Lijnen, 1991; Vassali et al., 1991). O tPA humano é uma serino-protease produzida pelo endotélio e certos tipos de células do sistema hematopoiético como os monócitos e os megacariócitos e é o principal ativador de plasminogênio encontrado no plasma (Wu e Zhao, 2002).

O PAI-1 é o principal inibidor de tPA e de uPA, regulando negativamente o sistema fibrinolítico (Loskutoff *et al*, 1989; Sprengers e Kluft, 1987), sintetizado pelas células endoteliais, hepatócitos e células musculares lisas. A produção e a liberação de PAI-1 nessas células podem ser induzidas por uma série de ativadores como a trombina, endotoxina e

citocinas. Células adiposas e plaquetas também produzem PAI-1 (Wu e Zhao, 2002). Funcionalmente, existem dois tipos de PAI-1, uma forma ativa e outra inativa ou latente. Somente a forma latente é capaz de se ligar a tPA e uPA e inibir as suas atividades fibrinolíticas (Wu e Zhao, 2002).

tPA forma um complexo molecular com estequiometria de ligação 1:1 com PAI-1. Uma vez formado, o complexo é inativo e removido da circulação, provavelmente por interagir com receptores hepáticos. Em estudos populacionais existe uma relação direta entre as concentrações plasmáticas de tPA e PAI-1. Seguindo o equilíbrio de reação, uma alta concentração de tPA (e alta concentração de PAI-1) está associada a uma baixa atividade de tPA. Portanto, uma alta concentração de tPA é um marcador de alta concentração de PAI-1 e baixa atividade trombolítica intrínseca (de Bono, 1994).

A concentração de tPA observada nas amostras das pacientes C₂, C₃, C₄ e C_{4m} foi significativamente mais elevada do que no grupo C_{0a}. É possível que a alta concentração de tPA encontrada no plasma de nossas pacientes, reflita um aumento da síntese de tPA pelo endotélio, resultante de um mecanismo para compensar a baixa atividade fibrinolítica de tPA. Em nosso estudo não avaliamos a concentração plasmática de PAI-1 e sim a sua atividade plasmática que permaneceu muito similar em todos os grupos estudados, não apresentando diferenças significativas inter-grupos. Provavelmente houve um aumento dos níveis de PAI-1 nos grupos C₂, C₃, C₄ e C_{4m} que acompanhou a elevação das concentrações de tPA nesses grupos, mantendo a atividade de PAI-1 muito similar nos grupos estudados. Em outro estudo (Yasim et al., 2008) foi observado que não houve diferença significativa entre a concentração de tPA de amostras de plasma provenientes da veia braquial dos controles, em relação aos níveis plasmáticos dos pacientes em estágio clínico C₂ de DVC primária.

O vWF é uma glicoproteína sintetizada exclusivamente nas células endoteliais e megacariócitos com duas funções principais: (1) carrear o fator VIII na circulação, necessário para a sua estabilidade (carreando o fator VIII, o vWF pode coordenar a formação de trombos ricos em fibrina e plaquetas no local da lesão endotelial); (2) mediar a adesão inicial de plaquetas no espaço subendotelial, por meio da ligação de receptores específicos presentes na superfície das plaquetas ao tecido conjuntivo subendotelial (Lip e Blann, 1995; Lip e Blann, 1997).

O vWF secretado constitutivamente é encontrado na membrana basal ou livre no plasma. Uma quantidade adicional de vWF está presente nos corpos Weibel-Palade nas células endoteliais e é liberada, por exocitose, em resposta à lesão vascular (Lip e Blann,

1997). Os multímeros encontrados nos corpos Weibel-Palade são ricos na forma *ultra large* de vWF (UL-vWF) diferentemente dos multímeros encontrados no plasma em condições normais (Sporn et al., 1986; Sporn et al., 1987). A forma UL-vWF é altamente trombogênica podendo se ligar às plaquetas espontaneamente e causar agregação plaquetária (Sporn *et al*, 1986; Sporn et al., 1987). O UL-vWF, ao ser liberado no plasma, é rapidamente clivado pela enzima ADAMTS-13 (Desintegrina e Metaloproteinase com motif tipo1 de Trombospondina-13) originando formas menores de vWF que são incapazes de se ligar espontaneamente às plaquetas (Dong *et al*, 2002). Para que haja a formação do trombo é necessário que a concentração de UL-vWF liberado pelas células endoteliais se sobreponha à atividade catalítica de ADAMTS-13 (Bowen e Collins, 2006).

A maior parte do vWF plasmático provém das células endoteliais e uma menor parte é oriunda das plaquetas. Por esse motivo o vWF é considerado um bom marcador de disfunção endotelial, estando seus níveis circulantes diretamente associados a uma série de doenças cardiovasculares como doença cardíaca isquêmica, doenças vasculares periféricas, aneurismas do ventrículo esquerdo, fibrilação atrial, doença vascular pulmonar, doença cérebro-vascular e TVP e aos fatores de risco cardiovasculares como o diabetes, hipertensão, homocistinúria, hipercolesterolemia e tabagismo (Lip e Blann, 1995; Lip e Blann, 1997; Constans e Conri, 2006).

Em nossos resultados observamos níveis crescentes da concentração plasmática de vWF do grupo C₂ ao grupo C_{4m} e um concomitante aumento significativo de vWF no grupo C_{4m} em relação aos grupos C₂, C₃ e C₄, correspondendo ao avanço da lesão endotelial esperado com a evolução da doença. Inesperadamente encontramos uma alta concentração plasmática de vWF no grupo C_{0a} com diferença significativa em relação ao grupo C₂. Em outro estudo (Saharay et al., 1998) foi observada diferença significativa da concentração plasmática (sangue coletado em uma veia dos membros inferiores) entre os grupos com veias varicosas e lipodermatosclerose. Entretanto, esse estudo não avaliou os níveis plasmáticos desse biomarcador no grupo controle. Posteriormente, em um outro estudo (Yasim et al., 2008) foi observado níveis plasmáticos (sangue coletado da veia ante-cubital) significativamente mais altos de vWF no grupo C₂ em relação ao grupo controle.

Uma explicação plausível para a alta concentração plasmática de vWF encontrada no plasma de nossas pacientes seria a redução da atividade de ADAMTS-13 nessas amostras, uma vez que não seria esperado uma lesão endotelial tão elevada nesse grupo. Em um estudo (Dong et al., 2004) foi relatado que a proteólise de UL-vWF por ADAMTS-13 pode variar

significativamente entre indivíduos. Assim é possível que as participantes desse grupo especificamente tenham uma baixa atividade de ADAMTS-13, alta concentração de UL-vWF e consequente vulnerabilidade à formação de trombos.

A TM é expressa especificamente na superfície das células endoteliais e se liga à trombina com alta afinidade. O complexo formado cliva a proteína C rapidamente para formar a proteína C ativada, que é um anticoagulante. O complexo formado entre a trombina e a TM também evita que a trombina, que é a enzima responsável pela formação do coágulo e um potente agregador plaquetário, seja capaz de converter o fibrinogênio em fibrina ou ativar as plaquetas (Esmon, 1995; Adams e Huntington, 2006). A forma solúvel da TM (sTM) é liberada do endotélio lesionado e é considerada um marcador de lesão endotelial (Constans e Conri, 2006). O aumento da concentração da sTM pode deixar o endotélio desprovido da forma de membrana de TM, tornando as células endoteliais incapazes de promover a ativação da proteína C aumentando, com isso, a tendência a formar trombos (Borgel et al., 2007). Em nosso estudo não encontramos um aumento progressivo significativo da concentração de sTM em relação à gravidade da doença. Apenas observamos que o grupo C₄ apresentou uma concentração plasmática de sTM significativamente menor relação aos grupos C₂, C₃ e C_{4m}. Em virtude do agravamento da disfunção endotelial, do processo inflamatório e do consequente aumento do risco de formação de trombos que imaginávamos encontrar no grupo C₄, esperaríamos que nesse grupo os níveis circulantes de TM fossem superiores aos dos grupos C₂ e C₃. A razão para o decréscimo da concentração de sTM especificamente nesse grupo é desconhecida.

As veias varicosas são caracterizadas pela dilatação e tortuosidade excessivas. Há um número crescente de evidências na literatura que mostram que a dilatação venosa precede o refluxo valvular, ou seja, que a disfunção valvular é um epifenômeno da dilatação da parede vascular (Gandhi et al., 1993; Kirsch et al., 2000; Raffetto e Khalil, 2008b; Raffetto et al., 2008). A dilatação das veias varicosas é resultado das alterações compensatórias na estrutura e função da parede vascular em decorrência das altas pressões hidrostáticas nas veias (Raffetto e Khalil, 2008a). Esse remodelamento tecidual progressivo que ocorre nas veias se deve, em grande parte, à atividade das MMPs e também ao seus ativadores e inibidores (Badier-Commander et al., 2000). As MMPs são secretadas na forma de pro-enzima (inativa) e requerem clivagem enzimática para ativação. Uma vez, ativadas elas degradam todos os componentes da matriz extracelular (Dollery et al., 1995). As MMPs são inibidas pelas TIMPs que formam, irreversivelmente, complexos de alta afinidade com as MMPs (Gomez et

al., 1997). Em nosso estudo avaliamos as concentrações sanguíneas totais (pro-enzima e enzima ativa) da MMP-2, MMP-3 e MMP-9, a concentração sérica de TIMP-1 e também a razão entre TIMP-1 e essas MMPs.

As concentrações séricas totais de MMP-2 nos grupos C₂ e C₃ foram estatisticamente mais baixas em relação ao grupo controle. Em compensação, a concentração sérica de TIMP-1 foi inferior (mas não significativamente) nos grupos C₂ e C₃ em relação ao grupo controle. Como resultado, observamos uma razão MMP-2/TIMP-1 muito similar entre os três grupos, não havendo diferença estatística entre os mesmos. Como a atividade de MMPs é finamente regulada pelas TIMPs, em condições normais, acreditamos que o acréscimo nos níveis circulantes do grupo controle foi compensado pelo aumento da concentração de TIMP-1, mantendo um equilíbrio entre as atividades anti-proteolíticas e proteolíticas que é também muito similar ao observado nos grupos C₂ e C₃. Entretanto, com a progressão da doença observamos um decréscimo significativo na razão TIMP-1/MMP-2 entre os grupos C₂ e C₄ e C₃ e C₄ que acreditamos ser uma evidência do desequilíbrio nessa razão em favor do aumento da proteólise pela MMP-2.

Com relação à MMP-3 não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos totais dessa metaloproteinase bem como não foi observada diferença estatística entre os grupos com relação à razão TIMP-1/MMP-3.

A concentração plasmática de MMP-9 foi estatisticamente superior nos grupos C₂ e C₄ em relação ao grupo controle. Além disso, a razão TIMP-1/MMP-9 foi significativamente menor nesses grupos e no grupo C₃, em comparação ao grupo controle, sugerindo uma tendência em favor da proteólise da matriz extracelular nesses grupos.

Alguns estudos relatam o aumento da expressão de MMP-2 em fragmentos de veias varicosas em relação a fragmentos de veias não-varicosas (Kowalewski et al. 2004; Sansilvestri-Morel et al., 2007), outros diminuição (Parra et al., 1998). Não há alteração quanto a expressão de MMP-2 em cultura de células da musculatura lisa vascular provenientes de veias varicosas, em relação às oriundas das veias normais (Sansilvestri-Morel et al., 1998).

Com relação à MMP-3, alguns autores reportam um aumento da expressão em amostras de veias varicosas comparado às veias normais (Kowalewski et al., 2004; Sansilvestri-Morel et al., 2007). Foi descrito, também, um aumento da expressão de MMP-3 em cultura de células da musculatura lisa vascular extraída de veias varicosas, em relação às obtidas de veias normais. Esse aumento de expressão foi atribuído ao fato da MMP-3 ser

direta ou indiretamente (através da ativação de outras MMPs) envolvida na degradação do colágeno III e fibronectina da parede venosa (Sansilvestre-Morel et al., 2005).

Um estudo descreveu aumento na expressão de MMP-9 nas veias varicosas em comparação às veias controles (Kosugui et al., 2003), enquanto outro relatou redução na expressão dessa enzima nas veias varicosas, em relação a veias normais e que há variação regional da expressão de MMP-9 na veias varicosas, em comparação as veias normais (Woodside et al., 2003). Outro estudo (Sansilvestrini-Morel et al., 1998) reportou que não houve alteração na expressão dessa enzima em cultura de células da musculatura lisa vascular extraída de veias varicosas, em relação às obtidas das veias normais. Em outro estudo (Jacob et al., 2002) foi reportado aumento da atividade plasmática da pro-MMP-9 no sangue colhido das veias varicosas em comparação ao sangue colhido da veia braquial.

Em relação à TIMP-1, alguns estudos (Parra et al., 1998; Sansilvestrini-Morel et al., 2007) reportaram aumento da expressão de TIMP-1 em veias varicosas em relação as veias controles. Entretanto, em outro estudo (Woodside et al., 2003) foi relatado que não houve alteração na expressão desse inibidor nas veias varicosas em comparação as veias controles. Além disso, não houve alteração na expressão de TIMP-1 em cultura de células musculares lisas obtidas de veias varicosas em relação àquelas extraídas de veias controles (Sansilvestri-Morel et al., 1998).

Somente um estudo (Badier-Commander et al., 2000) relacionou a concentração de MMPs com a concentração de TIMPs encontrada em fragmentos de veias varicosas e de veias normais. Nesse estudo foi observado que a razão TIMP-1/MMP-2 foi 3,6 vezes maior nas veias varicosas em comparação às veias controles e os autores atribuíram esse resultado ao fato de haver um desequilíbrio entre a produção de TIMP-1 e MMP-2 em favor do aumento da atividade anti-proteolítica nas veias varicosas em comparação às veias normais o que poderia explicar, em parte, a tendência ao acúmulo de matriz extracelular na parede das veias varicosas. Esses resultados contrastam com os nossos dados e essa divergência pode ser decorrente de calcularmos a razão TIMP-1/MMP-2 através da concentração sérica desses dois biomarcadores e não de amostras extraídas do próprio tecido venoso.

Com o avanço da DVC, alterações cutâneas nos membros inferiores dos pacientes começam a ser observadas e estão associadas à microangiopatia (Virgini-Magalhães et al., 2006). A microangiopatia na DVC é caracterizada por um número reduzido de capilares dilatados, enrolados e ramificados com aparência semelhante aos glomérulos renais e, dependendo da gravidade da doença, pode ocorrer trombose microvascular e aumento da

permeabilidade dos vasos linfáticos (Howlader e Coleridge-Smith, 2004). Os fatores que induzem a proliferação do endotélio capilar na microangiopatia ainda não foram elucidados, entretanto acredita-se que o VEGF tenha uma forte implicação nessas alterações do leito microvascular que acometem os pacientes com DVC (Howlader e Coleridge-Smith, 2004).

Em um estudo (Yasim et al., 2008) foi reportado aumento estatisticamente significativo dos níveis plasmáticos (sangue coletado da veia braquial) de VEGF em pacientes em estágio C₂ em relação aos controles corroborando com nossos resultados em que encontramos níveis significativamente mais elevados de VEGF nos grupos C₂, além dos grupos C₄ e C_{4m}. É importante ressaltar que nos grupos C₄ e C_{4m} as manifestações cutâneas, como a lipodermatosclerose, estão presentes o que explica as altas concentrações de VEGF. O VEGF é secretado em resposta a hipertensão venosa local e tem uma participação importante na permeabilidade vascular, edema tecidual, deposição de fibrina e lipodermatosclerose (Yasim et al., 2008). Outros estudos mostraram que a concentração plasmática de VEGF, em amostras de sangue coletados de veias dos membros inferiores, é significativamente mais alta nos pacientes em relação aos controles (Shoab et al., 1998). Em outro estudo foi demonstrado que os níveis plasmáticos de VEGF (de amostras sanguíneas retiradas das veias dos membros inferiores) foram significativamente mais elevados no grupo com úlcera varicosa, em relação ao grupo controle (Howlader e Coleridge-Smith, 2004). Entretanto, em outro estudo não foi encontrada diferença estatística na concentração plasmática de VEGF (sangue coletado da veia braquial) entre o grupo controle e o grupo de pacientes (Hollingsworth et al., 2001).

A Angiopietina-1 é liberada constitutivamente pelas células perivasculares e desempenha um papel importante na homeostase e proteção vascular contra a inflamação (Augustin *et al.*, 2009). Angiopietina-1 é um fator primordial para manutenção da integridade endotelial, prevenindo a apoptose, a formação de trombos e a inflamação vascular (Koh, 2013). Um estudo demonstrou que a infusão endovenosa de Angiopietina-1 recombinante melhorou a disfunção múltipla de órgãos em um modelo de sepse experimental, muito provavelmente por manter a integridade endotelial nesses animais (David et al., 2011). Além disso, a Angiopietina-1 é capaz de inibir o aumento da permeabilidade vascular induzido pelo VEGF (Koh et al., 2013).

A Angiopietina-2 é armazenada nos corpos Weibel-Palade nas células endoteliais, sendo liberada após estímulo (Fiedler et al., 2004). A Angiopietina-2 bloqueia a via de sinalização da Angiopietina-1 e, em virtude disso, desestabiliza a vasculatura, leva à

apoptose das células endoteliais e regressão do vaso sanguíneo na presença ou ausência de VEGF (Ballabh et al., 2007; Herouy et al., 2009).

A concentração plasmática de Angiopietina-1 foi significativamente mais alta nos grupos C₄ e C_{4m} em relação ao grupo C_{0a} o que foi interessante pois nesses grupos também observamos concentrações plasmáticas mais elevadas de VEGF em relação aos controles. Esses dados sugerem que o aumento da concentração plasmática de Angiopietina-1 seja um mecanismo compensatório do organismo para diminuir a permeabilidade vascular causada pelo VEGF e, com isso, restabelecer o controle da passagem dos componentes plasmáticos e da circulação das células entre o sangue e os tecidos pelas células endoteliais.

Em nosso estudo não encontramos diferença significativa na concentração plasmática de Angiopietina-2. A Angiopietina-2 é altamente expressa na angiogênese tumoral (Vajkoczy et al., 2002), em áreas de hipóxia tecidual (Koga et al., 2001). Além disso, diversos tipos de câncer causam aumento significativo da concentração sanguínea de Angiopietina-2 (Thomas e Augustin, 2009). Foi reportado também aumento dos níveis séricos de Angiopietina-2 em pacientes sépticos, o que se correlaciona diretamente com a mortalidade desses pacientes. (Parikh et al., 2006; Gallagher et al., 2008; Orfanos et al., 2007; Siner et al., 2009). Não encontramos diferenças estatísticas na concentração de Angiopietina-2 entre os grupos, pois supomos que os níveis circulantes de Angiopietina-2 se elevem em condições patológicas severas com quadro inflamatório grave e sistêmico como o câncer e a sepse, o que não é o caso da DVC.

Não observamos também diferenças estatísticas entre os grupos com relação à razão Angiopietina-1/Angiopietina-2 indicando que a progressão da DVC não afeta o equilíbrio entre esses dois fatores. Em um estudo envolvendo pacientes com mieloma foi observado que a redução progressiva da razão Angiopietina-1/Angiopietina-2 se correlaciona com o agravamento dos sintomas e diminuição da sobrevivência desses pacientes (Terpos et al., 2012).

A Angiopietina-1 e Angiopietina-2 são ligantes para receptor tirosina-quinase Tie-2 presente na superfície das células endoteliais. Existe também uma forma solúvel do receptor Tie-2 (sTie-2) que resulta de clivagem proteolítica do receptor ligado à membrana (Findley et al., 2008).

Alguns estudos demonstraram níveis elevados de sTie-2 em doenças caracterizadas pelo remodelamento vascular como insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão e síndromes coronarianas agudas (Chung et al., 2003; Chong et al., 2004; Lee et al., 2004;

Nadar et al., 2005). A concentração sanguínea de sTie-2 em pacientes com carcinoma de células renais se correlaciona com o estágio da doença e mortalidade, sugerindo uma correlação direta dos níveis circulantes de sTie-2 com o aumento da angiogênese tumoral (Harris et al., 2001). Entretanto, ainda não se sabe se a alta concentração circulante de sTie-2 é um marcador de sinalizações anormais ou de disfunção celular, sendo com isso uma consequência da doença ou se ela contribui para progressão da doença vascular (Findley, 2007). Inesperadamente em nosso estudo encontramos níveis plasmáticos significativamente menores de sTie-2 no grupo mais grave, o grupo C_{4m}, em relação aos grupos C₂, C₃ e C₄ o que contrasta com os dados da literatura que envolvem outras doenças. Com relação à DVC, nenhum outro estudo quantificou a forma circulante de Tie-2, e por isso, não sabemos como a concentração sanguínea desse biomarcador se comporta nos diferentes estágios clínicos da doença.

Uma outra característica das alterações cutâneas associadas a DVC é a fibrose tecidual da derme que alguns estudos relacionam ao aumento da expressão de TGF- β 1. Os leucócitos ativados transmigram da vasculatura e liberam TGF- β 1, que estimula a produção de colágeno pelos fibroblastos dérmicos culminando com a fibrose da derme (Pappas et al., 1999). Além disso, TGF- β é capaz de induzir ou de reprimir a proliferação das células endoteliais, dependendo do tipo de complexo de receptores na superfície das células endoteliais que ele estimule, e também da interação desse complexo com a Endogлина, seu receptor auxiliar (Lebrin e Mummery, 2008). Avaliamos em nosso estudo a participação da via do TGF- β na angiogênese e nas alterações cutâneas que ocorrem nos pacientes com DVC através da quantificação dos níveis séricos da forma solúvel da Endogлина (sEndogлина).

A Endogлина é um receptor auxiliar de TGF- β que age modulando a sua sinalização (ten Dijke et al., 2008). Em uma variedade de células incluindo os mioblastos, as respostas dependentes de TGF- β 1 que são reprimidas pela Endogлина compreendem a inibição da proliferação celular, adesão celular, fosforilação da molécula de adesão célula endotelial-plaqueta-1(PECAM-1) e aumento da expressão de componentes da matriz extracelular colágeno e fibronectina (Bernabeu et al., 2007). Apesar de TGF- β ser um potente inibidor da proliferação celular, a presença de Endogлина bloqueia esse efeito (Lastres et al., 1996; Li et al., 2000). A correlação direta da expressão da Endogлина com aumento da proliferação celular foi confirmada em diversos modelos experimentais (Bernabeu et al., 2007). Além disso, a Endogлина é altamente expressa no endotélio em proliferação durante o processo de angiogênese (Burrows et al., 1995; Bodey et al., 1998; Fonsatti *et al.*, 2003) e também está

envolvida na estabilização da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) produtora de NO (Toporsian et al., 2005).

A forma solúvel de Endogлина (sEndogлина) é liberada na circulação por *shedding* proteolítico e antagoniza sua forma de membrana (ten Dijke et al., 2008). A sEndogлина inibe a formação do tubo capilar *in vitro* e induz a permeabilidade capilar e hipertensão *in vivo* (Venkatesha et al., 2006). Altos níveis séricos de sEndogлина têm sido associados à pré-eclâmpsia (Levine et al., 2004; Levine et al., 2006) e à angiogênese tumoral (Fonsatti et al., 2001).

Acreditamos que o aumento da liberação da sEndogлина seja um mecanismo compensatório para inibição da proliferação do endotélio capilar em tecidos que estão sob intenso processo de angiogênese, o que parece não ser o caso da DVC ou então o processo de angiogênese que pode existir na DVC não é dependente da via de sinalização de TGF- β /Endogлина, uma vez que não encontramos diferença significativa dos níveis séricos de sEndogлина entre os grupos estudados. A sEndogлина também não foi avaliada em nenhum estudo com DVC e por isso não sabemos como seus níveis se correlacionam com o agravamento da doença.

Algumas evidências relacionam a DVC com o estresse oxidativo da parede da veia varicosa (Glowinski e Glowinski, 2002; Karatepe et al., 2010). O aumento do estresse oxidativo está associado à gênese da disfunção endotelial, que por sua vez, está associada à disfunção valvular que, entre outros fatores, pode levar ao desenvolvimento das veias varicosas (Guzik et al., 2011). Para avaliar o estresse oxidativo em nosso estudo, utilizamos a *ent*-Prostaglandina F_{2 α} , um composto pertencente à família dos F₂-isoprostanos que são compostos com potentes atividades biológicas e sua quantificação representa um índice confiável do estresse oxidativo *in vivo* (Montine e Morrow, 2005). Níveis elevados de F₂-isoprostanos foram encontrados em pacientes com aterosclerose e desordens neurodegenerativas, que são doenças caracterizadas pelo aumento do estresse oxidativo (Morrow et al., 1990). Os isoprostanos são compostos semelhantes às prostaglandinas. Entretanto, diferentemente das prostaglandinas que são geradas a partir do ácido araquidônico pela ação enzimática das ciclooxigenases, os isoprostanos são originados da auto oxidação do araquidonato por ROS (Yin et al., 2007).

Em nosso estudo não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos com relação aos níveis urinários da *ent*-Prostaglandina F_{2 α} . Outro estudo (Guzik et al., 2011) relatou aumento da produção de radicais superóxido em amostras de veias varicosas em

relação a veias normais, e que esse aumento é decorrente da atividade de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases e da NOS desacoplada. Krzysciak e Kóska (2011) reportaram aumento significativo da concentração do malonildialdeído (MDA), um marcador de estresse oxidativo, em amostras de veias de pacientes com DVC, em relação às veias normais e, concomitantemente, foi observado diminuição significativa da atividade da superóxido dismutase (SOD) e da capacidade antioxidante total nas amostras de veias varicosas em comparação as amostras controles. Em outro estudo (Condezo-Hoyos et al., 2013) foi relatado aumento significativo da concentração plasmática de proteína carbonilada e da concentração de MDA ligado a proteínas em pacientes com estágio clínico C₂, em relação aos controles e diminuição da concentração plasmática da glutathione reduzida e da atividade plasmática da catalase que são biomarcadores relacionados a defesa antioxidante. No entanto, em outro estudo (Yasim et al., 2008) não foi encontrada diferença estatística entre os níveis plasmáticos (sangue coletado da veia braquial) de MDA nos pacientes C₂ e nos controles. Não encontramos diferenças estatísticas entre controles e pacientes com relação a concentração urinária de *ent*-Prostaglandina F_{2α} possivelmente, por esse composto não ser um bom marcador de estresse oxidativo para a DVC ou o tipo de espécime, nesse caso a urina, não refletir os níveis de estresse oxidativo encontrados na parede de veias varicosas, como foi descrito em dois outros estudos (Guzik et al., 2011; Krzysciak e Kóska, 2011).

Existe uma série de evidências na literatura que associam a disfunção endotelial à diminuição da produção de estrogênio após a menopausa natural ou cirúrgica ou na falência ovariana prematura (Taddei et al, 1996; Mercurio et al., 1999; Sanada et al., 2003; Kalantaridou et al., 2004;). A ação do estrogênio no sistema cardiovascular pode ser de maneira direta nos vasos sanguíneos ou, indiretamente, através da modulação dos fatores de risco cardiovasculares como, o perfil lipídico (Bush et al., 1987). Os efeitos diretos do estrogênio sobre o endotélio compreendem: vasodilatação aguda mediada pelo aumento da síntese e biodisponibilidade do NO (Mendelsohn e Karas, 1999; Khalil, 2005); modulação a longo-prazo do tônus vascular por meio da produção de prostaglandinas, expressão dos genes de eNOS e de endotelina (Hermenegildo et al., 2006; Maturana et al., 2007); inibição da vasoconstrição induzida pela endotelina (Nilsson e Gustafsson, 2000). Por ser um fator de proteção endotelial supomos que a falta do estrogênio seja um fator que concorre com a idade para o agravamento da DVC nas pacientes C_{4m}. Ao compararmos o resultado da concentração de vWF (biomarcador de lesão endotelial) entre os grupos C_{4m} e C₄ que possuem o mesmo estágio clínico da doença, ainda assim observamos aumento significativo da concentração

desse biomarcador no grupo C_{4m} em comparação ao grupo C₄ evidenciando um maior comprometimento da função endotelial no grupo C_{4m}.

Além da limitação gerada pela variável idade, que já foi comentada no princípio da discussão, uma outra limitação de nosso estudo foi o local de coleta de sangue para avaliação dos biomarcadores. Na maioria dos estudos que abordam a DVC e marcadores sanguíneos, o sangue é aspirado de veias dos membros inferiores e, em grande parcela desses estudos, o sangue é retirado após o paciente permanecer sentado ou em ortostase por 30-45 minutos. Essas manobras induzem à hipertensão venosa nos membros inferiores e acentuam o processo inflamatório já estabelecido nos pacientes com DVC. Como o sangue é removido próximo do foco inflamatório, é esperado que os níveis circulantes de certos biomarcadores estejam mais elevados nesse local do que no braço, onde foi realizada a punção venosa em nosso estudo. Talvez alguns resultados não tenham correspondido ao esperado por estarmos coletando sangue de um local distante do sítio inflamatório e também por não provocarmos uma hipertensão venosa. Entretanto, outro estudo (Jacob et al., 2002) demonstrou que não há diferença significativa entre os níveis circulantes de sICAM-1, sVCAM-1 e sL-selectina entre o sangue puncionado da veia braquial e da veia varicosa. Esses autores também verificaram que não há diferença significativa entre as concentrações sanguíneas de vWF, sTM, VEGF e sL-selectina antes e após a hipertensão venosa experimental. Além disso, foi constatado nesse estudo que os níveis circulantes de sICAM-1 e sVCAM-1 são alterados significativamente após a hipertensão venosa. Um estudo (Danielsson et al., 2003) mostrou que a hipertensão venosa não influencia a concentração sérica de IL-6, sICAM-1, sVCAM-1 e sL-selectina. Em outro estudo (Lu et al., 2006) relatou que a hipertensão venosa não altera significativamente a concentração sérica de sP-selectina.

Outra limitação de nosso estudo foi a escassez de trabalhos que avaliam os níveis sanguíneos de biomarcadores por ELISA e também a falta de trabalhos que comparem controles e pacientes estratificados em estágios clínicos CEAP e envolvam somente mulheres. Em geral, muitos trabalhos quantificam biomarcadores em amostras de pele de membros inferiores e avaliam a expressão destes em fragmentos de veias por técnicas como imunohistoquímica e western blotting. Paralelamente, a grande parte dos estudos compara o grupo controle a um grupo de pacientes com DVC, não fazendo distinção entre os estágios clínicos, a etiologia (primária ou secundária) da doença e o gênero dos participantes, o que dificultou relacionar nossos resultados com os de outros estudos.

6 RESUMO DOS ACHADOS

Os principais achados desse estudo foram:

- a) Os níveis séricos de IL-6 no grupo C_{4m} são significativamente maiores do que os níveis encontrados nos grupos C_{0a} e C_2 ;
- b) Redução significativa da concentração sérica de sL-selectina nos grupos C_2 , C_3 , C_4 e C_{4m} em comparação ao grupo C_{0a} , sugerindo que pacientes com DVC apresentam um defeito específico no processo de *shedding*;
- c) Não há alteração significativa dos níveis circulantes de sE-selectina, sP-selectina e sICAM entre os grupos;
- d) Aumento significativo da concentração sérica de sVCAM-1 somente entre os grupos C_3 e C_{4m} ;
- e) Elevação significativa da concentração de tPA nas pacientes C_2 , C_3 , C_4 e C_{4m} em relação ao grupo C_{0a} , possivelmente, para compensar a baixa atividade fibrinolítica de tPA;
- f) A atividade plasmática de PAI-1 não apresentou diferenças significativas inter-grupos sugerindo aumento dos níveis circulantes de PAI-1 nos grupos C_2 , C_3 , C_4 e C_{4m} para acompanhar a elevação das concentrações de tPA nesses grupos mantendo a atividade de PAI-1 muito semelhante nos grupos estudados;
- g) Aumento significativo de vWF no grupo C_{4m} em relação aos grupos C_2 , C_3 e C_4 sugerindo avanço da lesão endotelial. Entretanto, houve uma alta concentração de vWF no grupo C_{0a} com diferença significativa em relação ao grupo C_2 o que pode ser explicado pela redução da atividade de ADAMTS-13;

- h) A concentração plasmática de sTM foi estatisticamente menor no grupo C₄ em relação aos grupos C₂, C₃ e C_{4m};
- i) A concentração sérica total de MMP-2 no grupo controle foi estatisticamente mais alta que as encontradas nos grupos C₂ e C₃, em compensação a concentração sérica de TIMP-1 foi mais elevada (não estatisticamente) no grupo controle em relação aos grupos C₂ e C₃. Como resultado, a razão TIMP-1/MMP-2 foi semelhante entre os três grupos. Com a progressão da doença há decréscimo significativo na razão TIMP-1/MMP-2 entre os grupos C₂ e C₄ e C₃ e C₄ evidenciando um desequilíbrio nessa razão em favor do aumento da proteólise pela MMP-2;
- j) Com relação à MMP-3 não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos totais e não foi observada diferença estatística entre os grupos com relação a razão TIMP-1/MMP-3;
- k) A concentração plasmática de MMP-9 foi estatisticamente superior nos grupos C₂ e C₄ em relação ao grupo controle. Além disso, a razão TIMP-1/MMP-9 foi significativamente menor nesses grupos e no grupo C₃ em comparação ao grupo controle sugerindo uma tendência em favor da proteólise da matriz extracelular nesses grupos;
- l) Houve elevação significativa dos níveis plasmáticos de VEGF nos grupos C₂ e nos grupos C₄ e C_{4m};
- m) A concentração de Angiopietina-1 foi significativamente mais alta nos grupos C₄ e C_{4m} em relação ao grupo C_{0a} e nesses grupos também houve aumento das concentrações de VEGF em relação ao grupo controle, sugerindo o envolvimento da Angiopietina-1 no mecanismo compensatório para diminuir permeabilidade vascular causada pelo VEGF;

- n) Não encontramos diferenças estatísticas na concentração de Angiopietina-2 entre os grupos, pois supomos que seus níveis se elevem em condições patológicas severas com quadro inflamatório grave e sistêmico o que não é o caso da DVC;
- o) Não houve diferenças estatísticas entre os grupos com relação à razão Angiopietina-1/Angiopietina-2 indicando que a progressão da DVC não afeta o equilíbrio entre esses dois fatores;
- p) Encontramos níveis plasmáticos significativamente menores de sTie-2 no grupo C_{4m};
- q) Não observamos diferenças significativas dos níveis séricos de sEndogлина entre os grupos, sugerindo que o processo de angiogênese que pode existir na DVC não é dependente da via de sinalização de TGF- β /Endogлина;
- r) Não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos com relação à concentração urinária de *ent*-Prostaglandina F_{2 α} ;
- s) Houve aumento significativo da concentração de vWF no grupo C_{4m} em comparação ao grupo C4 evidenciando um maior comprometimento da função endotelial no grupo C_{4m}, possivelmente causado pela deficiência de estrogênio.

CONCLUSÃO

Não foi identificado nenhum biomarcador que se correlacionasse diretamente ou inversamente com a progressão da DVC, provavelmente devido à diversidade de fatores envolvidos e à complexa interação entre eles durante o curso da doença.

REFERÊNCIAS

- Abbate LPF, Lastória S. Abordagem de pacientes com úlcera de perna de etiologia venosa. *An Bras Dermatol*. 2006; 81:509-22.
- Abramson JH, Hopp C, Epstein LM. The epidemiology of varicose veins. A survey in western Jerusalem. *J Epidemiol Community Health*. 1981; 35:213-7.
- Adams TE, Huntington JA. Thrombin-cofactor interactions: structural insights into regulatory mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26:1738-45.
- Ando J, Yamamoto K. Vascular mechanobiology- Endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circ J*. 2009; 73: 1983-1992.
- André P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol*. 2004;126: 298–306.
- Atta HM. Varicose veins: Role of mechanotransduction of venous hypertension. *Int J Vasc Med*. 2012; 2012:538627
- Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis , homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10:165-77.
- Badier-Commander C, Verbeuren T, Lebard C, Michel JB , Jacob MP. Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: a possible explanation for extracellular matrix accumulation. *J Pathol* 2000; 192:105-12.
- Ballabh P, Xu H, Hu F, Braun A, Smith K, Rivera A et al. Angiogenic inhibition reduces germinal matrix hemorrhage. *Nat Med*. 2007; 13: 477-485.
- Banks RE, Gearing AJ, Hemingway IK, Norfolk DR, Perren TJ, Selby PJ. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer*. 1993;68:122-4
- Beebe-Dimmer JL, Pfeifer JR, Engle JS, Schottenfeld D. The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Ann Epidemiol*. 2005; 15:175-184.
- Bergan JJ. Molecular mechanisms in chronic venous insufficiency. *Ann Vasc Surg* 2007; 21:260-266.
- Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW, Smith PDC, Nicolaidis AN, Boisseau MR , Eklöf B. Mechanisms of Disease: Chronic Venous Disease. *N England J Med*. 2006; 355: 488-498.
- Bernabeu C, Conley BA, Vary CPH. Novel Biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem*. 2007; 102: 1375-1388.
- Blalock A. Oxygen content of blood in patients of varicose veins. *Arch Surg*. 1929;19:898-905.

Blann AD, Noteboom WM, Rosendaal FR. Increased soluble P-selectin levels following deep venous thrombosis: cause or effect? *Br J Haematol.* 2000;108:191-3.

Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Over-expression of endoglin (CD105): a marker of breast carcinoma-induced neo-vascularization. *Anticancer Res.* 1998;18:3621-8.

Boisseau MR, de La Giclais B. Chronic venous diseases: Roles of various pathophysiological factors. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2004; 31: 67-74.

Borgel D, Bornstain C, Reitsma PH, Lerolle N, Gandrille S, Dali-Ali F et al. A comparative study of the protein C pathway in septic and nonseptic patients with organ failure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:878-85.

Bowen DJ, Collins PW. Insights into von Willebrand factor proteolysis clinical implications. *Br J Haematol.* 2006;133:457-67.

Browse NL, Burnand KG. The cause of venous ulceration. *Lancet.* 1982; 2:243-5.

Brindle NPJ, Saharinen P, Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ Res.* 2006; 98: 1014-1023.

Bryan LJ, Callas PW, Criqui MH, Cushman M. Higher soluble P-selectin is associated with chronic venous insufficiency: the San Diego Population Study. *Thromb Res* 2012;130(5):716-9.

Bryan Jr RM, You J, Golding EM, Marrelli SP. Endothelium-derived hyperpolarizing factor a cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology.* 2005; 102:1261–1277.

Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins.* 1976; 12:897-913.

Burger PC, Wagner DD. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood.* 2003;101, 2661–2666.

Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res.* 1995;1:1623-34.

Bush TL, Barret-Connor E, Cowan LD, Criqui MH, Wallace RB, Suchindran CM. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-Up Study. *Circulation.* 1987; 75:1102-9.

Carpentier PH, Maricq HR, Biro C, Ponçot-Makinen CO, Franco A. Prevalence, risk factors, and clinical patterns of chronic venous disorders of lower limbs: a population-based study in France. *J Vasc Surg.* 2004; 40:650-9.

Castro e Silva M, Cabral ALS, Barros Jr N, Castro, AA, Santos, MERC. Diagnóstico e tratamento da doença venosa crônica. *J Vasc Bras.* 2005; 4:S189-S194.

- Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, De Blasi A, Ready N, Furie BC et al. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 8767–8771.
- Champagne B, Tremblay P, Cantin A, St. Pierre I. Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J Immunol*. 1998; 161: 6398.
- Chiesa R, Marone EM, Limoni C, Volonté M, Schaefer E, Petrini O. Demographic factors and their relationship with the presence of CVI signs in Italy: the 24-cities cohort study. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2005; 30:674-80.
- Chong AY, Caine GJ, Freestone B, Blann AD, Lip GY. Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, and angiopoietin receptor tie-2 levels in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43:423–428.
- Chung NAY, Makin AJ, Lip GYH. Measurement of the soluble angiopoietin receptor tie-2 in patients with coronary artery disease: development and application of an immunoassay. *European J Clin Invest*. 2003; 33: 529–535. 12.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998; 91:3527-61.
- Clarke GH, Vasdekis SN, Hobbs JT, Nicolaidis AN. Venous wall function in the pathogenesis of varicose veins. *Surgery*. 1992;111:402-8.
- Coleridge-Smith PD, Thomas P, Scurr JH, Dormandy JA. Causes of venous ulceration: A new hypothesis. *Br Med J*. 1988; 296:1726-1727.
- Coleridge-Smith PD. Update of chronic venous insufficiency-induced inflammatory processes. *Angiology* 2001;52: S35–42.
- Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood*. 1991;78:3114-24.
- Condezo-Hoyos L, Rubio M, Arribas SM, España-Caparrós G, Rodríguez-Rodríguez P, Mujica-Pacheco E et al. A plasma oxidative stress global index in early stages of chronic venous insufficiency. *J Vasc Surg*. 2013;57: 205-13.
- Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 2006; 368:33-47.
- Corcos L, De Anna D, Dini M, Macchi C, Ferrari PA, Dini S. Proximal long saphenous vein valves in primary venous insufficiency. *J Mal Vasc*. 2000; 25:27-36.
- Corcos L, Procacci T, Peruzzi G, Dini M, De Anna D. Sapheno-femoral valves. Histopathological observations and diagnostic approach before surgery. *Dermatol Surg*. 1996; 22:873-80.

- Criqui MH, Jamosmos M, Fronck A, Denenberg JO, Langer RD, Bergan J et al. Chronic venous disease in an ethnically diverse population: the San Diego Population Study. *Am J Epidemiol.* 2003; 158:448-56.
- Danielsson G, Norgren L, Truedsson L, Andreasson A, Danielsson P, Nilsson A et al. Flavonoid treatment in patients with healed venous ulcer: flow cytometry analysis suggests increased CD11b expression on neutrophil granulocytes in the circulation. *Vasc Med.* 2003; 8:83-8.
- Darvall KA, Bate GR, Adam DJ, Bradbury AW. Generic health-related quality of life is significantly worse in varicose veins patients with lower limb symptoms independent of CEAP clinical grade. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2012; 44:341-4.
- David S, Park JK, Meurs MV, Zijlstra JG, Koenecke C, Schrimpf C et al. Acute administration of recombinant Angiopoietin-1 ameliorates multiple organ dysfunction syndrome and improves survival in murine sepsis. *Cytokine.* 2011; 55:251-9
- Deanfield JE, Halcox, JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007; 115:1285-1295.
- Deatrick KB, Wakefield TW, Henke PK. Chronic venous insufficiency: current management of varicose vein disease. *Am Surg* 2010; 76:125-32.
- de Bono D. Significance of raised plasma concentrations of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in patients at risk from ischaemic heart disease. *Br Heart J.* 1994; 71:504-507.
- de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, Sixma JJ. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation.* 1992; 85:2284-90.
- Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995;77:863-8
- Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN et al. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood.* 2002; 100: 4033–4039.
- Dong JF, Whitelock J, Bernardo A, Ball C, Cruz MA. Variations among normal individuals in the cleavage of endothelial-derived ultra-large von Willebrand factor under flow. *J Thromb Haemos.* 2004; 2: 1460–146.
- Duits AJ, Pieters RC, Saleh AW, van Rosmalen E, Katerberg H, Berend K et al. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996; 81:96-8.
- Dunlop LC, Skinner MP, Bendall LJ, Favalaro EJ, Castaldi PA, Gorman JJ et al. Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein. *J Exp Med.* 1992; 175:1147–1150.

- Eklöf B, Perrin M, Delis K, Rutherford R. Updated terminology of chronic venous disorders: the vein term Transatlantic interdisciplinary consensus document. *J Vasc Surg.* 2009; 49: 498-501.
- Eklöf B, Rutherford RB, Bergan JJ, Carpentier PH, Gloviczki P, Kistner RL et al. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. *J Vasc Surg.* 2004; 40:1248-52.
- Esmon CT. Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J.* 1995; 9:946-55.
- Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost.* 2000; 83:639-43.
- Evans CJ, Fowkes FGR, Ruckley CV, Lee AJ. Prevalence of varicose veins and chronic venous insufficiency in men and women in the general population: Edinburgh Vein Study. *J Epidemiol Community Health.* 1999; 53:149–153.
- Félétou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond).* 2009; 117:139-55.
- Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM et al. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood.* 2004;103:4150-6.
- Findley CM, Cudmore MJ, Ahmed A , Kontos CD. VEGF induces Tie2 shedding via a phosphoinositide 3-kinase/Akt dependent pathway to modulate Tie2 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:2619-2626.
- Findley CM, Mitchell RG, Duscha BD, Annex BH, Kontos CD. Plasma levels of soluble Tie2 and vascular endothelial growth factor distinguish critical limb ischemia from intermittent claudication in patients with peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52:387-93.
- Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S et al. Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol.* 2001; 188:1-7.
- Fonsatti E, Altomonte M, Arslan P, Maio M. Endoglin (CD105): a target for anti-angiogenic cancer therapy. *Curr Drug Targets.* 2003; 4:291-6.
- Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease - from marvel to menace. *Circulation.* 2006; 113:1708-1714.
- Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M et al. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J Cell Biol* 1992; 117: 895–902.
- França LHG, Tavares V. Insuficiência venosa crônica. Uma atualização. *Jornal Vasculare Brasileiro.* 2003; 2:318-28.

Furchgott, R F, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288: 373-376.

Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JJ, Jothian D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1984; 6:s336–s343.

Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2006:S3.

Gaboury J, Woodman RC, Granger DN, Reinhardt P, Kubes P. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am J Physiol*. 1993; 265: H862-7.

Gaboury JP, Anderson DC, Kubes P. Molecular mechanisms involved in superoxide-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo. *Am J Physiol*. 1994; 266:H637-42.

Gallagher DC, Parikh SM, Balonov K, Miller A, Gautam S, Talmor D et al. Circulating angiopoietin-2 correlates with mortality in a surgical population with acute lung injury/adult respiratory distress syndrome. *Shock*. 2008; 29:656-61.

Gandhi RH, Irizarry E, Nackman GB, Halpern VJ, Mulcare RJ, Tilson MD. Analysis of the connective tissue matrix and proteolytic activity of primary varicose veins. *J Vasc Surg*. 1993; 18:814-20.

Gearing AJ, Newman W: Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today*. 1993;14: 506 –512.

Gearing AJ, Hemingway I, Pigott R, Hughes J, Rees AJ, Cashman SJ. Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1: pathological significance. *Ann N Y Acad Sci*. 1992; 667:324-31.

Glowinsky J, Glowinsky S. Generation of reactive oxygen metabolites by the varicose vein wall. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002; 23:550–5

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*. 1997; 74:111-22.

Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*. 1994; 55:662-75.

Griffith, T.M. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *Br J Pharmacol*. 141:881-903, 2004.

Gryglewski R J, Bierion K, Dembinska-Kiec A, Kostka-Trabka E, Zembowicz A. Interaction between prostacyclin and molsidomine in blood cells and plasma. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 1991; 21B: 655-8.

Guyton AC, Hall JE. Distensibilidade vascular e funções dos sistemas arterial e venoso. In: Guyton AC, Hall JE (eds). *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. p. 177-186.

Guzik B, Chwała M, Matusik P, Ludew D, Skiba D, Wilk G et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human varicose veins. *Pol Arch Med Wewn.* 2011; 121:279-86.

Harris AL, Reusch P, Barleon B, Hang C, Dobbs N, Marme D. Soluble Tie2 and Flt1 extracellular domains in serum of patients with renal cancer and response to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1992–1997.

Hermenegildo C, Oviedo PJ, Cano A. Cyclooxygenases regulation by estradiol on endothelium. *Curr Pharm Des.* 2006;12:205-15.

Herouy Y, Kreis S, Mueller T, Duerk T, Martiny-Baron G, Reusch P et al. Inhibition of angiogenesis in lipodermatosclerosis: implication for venous ulcer formation. *Int J Mol Med.* 2009; 24:645-51.

Homans J. The ethiology and treatment of varicose ulcer of the leg. *Surg Gynecol Obstet.* 24:300-311, 1917.

Hollingsworth SJ, Tang CB, Dialynas M, Barker SG. Varicose veins: loss of release of vascular endothelial growth factor and reduced plasma nitric oxide. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2001; 22:551-6.

Howlader MH, Coleridge-Smith PD. Symptoms of chronic venous disease and associated with systemic inflammatory markers. *J Vasc Surg* 2003; 38:950–4

Howlader MH, Coleridge Smith PD. Relationship of Plasma Vascular Endothelial Growth Factor to CEAP Clinical Stage and Symptoms in Patients with Chronic Venous Disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004; 27, 89–93.

Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1985; 25: 171-191.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RN, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84: 9265-9269.

Jacob MP, Cazaubon M, Scemama A, Prié D, Blanchet F, Guillin MC, Michel JB. Plasma matrix metalloproteinase-9 as a marker of blood stasis in varicose veins. *Circulation.* 2002; 106:535-8.

Jander S, Heidenreich F, Stoll G. Serum and CSF levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in inflammatory neurologic diseases. *Neurology.* 1993;43:1809-13.

Jünger M, Steins A, Hahn M, Häfner HM. Microcirculatory dysfunction in chronic venous insufficiency (CVI). *Microcirculation.* 2000; 7:S3-12.

Jutila MA. Function and regulation of leukocyte homing receptors. *J Leukoc Biol.* 1994; 55:133-40.

- Kalantaridou SN, Naka KK, Papanikolaou E, Kazakos N, Kravariti M, Calis KA et al. Impaired endothelial function in young women with premature ovarian failure: normalization with hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:3907-13.
- Karatepe O, Unal O, Ugurlucan M, Kemik A, Karahan S, Aksoy M, Kurtoglu M. The impact of valvular oxidative stress on the development of venous stasis ulcer valvular oxidative stress and venous ulcers. *Angiology.* 2010; 61: 283-8.
- Khalil RA. Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. *Hypertension.* 2005; 46:249-54.
- Khodabandehlou T, Boisseau MR, Le Dévéhat C. Blood rheology as a marker of venous hypertension in patients with venous disease. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2004; 30:307-12.
- Kirsch D, Schreiber J, Dienes HP, Böttger T, Junginger T. Alterations of the extracellular matrix of venous walls in varicose veins. *Vasa.* 1999; 28:95-9.
- Kirsch D, Dienes HP, Kühle R, Duschner H, Wahl W, Böttger T, Junginger T. Changes in the extracellular matrix of the vein wall--the cause of primary varicosis? *Vasa.* 2000; 29:173-7.
- Koga K, Todaka T, Morioka M, Hamada J, Kai Y, Yano S, Okamura A, Takakura N, Suda T, Ushio Y. Expression of angiopoietin-2 in human glioma cells and its role for angiogenesis. *Cancer Res.* 2001; 61:6248-54.
- Koh GY. Orchestral actions of angiopoietin-1 in vascular regeneration *Trends Mol Med* 2013;19:31-9.
- Kosugi I, Urayama H, Kasashima F, Ohtake H, Watanabe Y. Matrix metalloproteinase-9 and urokinase-type plasminogen activator in varicose veins. *Ann Vasc Surg.* 2003;17:234-8.
- Kowalewski R, Sobolewski K, Wolanska M, Gacko M. Matrix metalloproteinases in the vein wall. *Int Angiol.* 2004;23:164-9.
- Kriegelstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens.* 2001; 14:44S-54S.
- Krishnan S, Nicholls SC. Chronic Venous Insufficiency: Clinical Assessment and Patient Selection. *Semin Intervent Radiol.* 2005; 22:169-177.
- Krzyściak W, Kózka M. Generation of reactive oxygen species by a sufficient, insufficient and varicose vein wall. *Acta Biochim Pol.* 2011;58:89-94.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4651-5.
- Kubes P, Kanwar S, Niu XF, Gaboury JP. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *FASEB J.* 1993;7:1293-9.

- Kurose I, Kubes P, Wolf R, Anderson DC, Paulson J, Miyasaka M et al. Inhibition of nitric oxide production. Mechanisms of vascular albumin leakage. *Circ Res.* 1993;73:164-71.
- Kurz X, Lamping DL, Kahn SR, Baccaglioni U, Zuccarelli F, Spreafico G et al. Do varicose veins affect quality of life? Results of an international population-based study. *J Vasc Surg.* 2001; 34:641-8.
- Kyrle PA, Hron G, Eichinger S, Wagner O. Circulating P-selectin and the risk of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2007; 97:880-3.
- Labropoulos N, Giannoukas AD, Delis K, Mansour MA, Kang SS, Nicolaides AN et al. Where does venous reflux start? *J Vasc Surg.* 1997; 26:736-42.
- Lastres P, Letamendía A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U et al.. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol.* 1996;133:1109-21.
- Laurikka JO, Sisto T, Tarkka MR, Auvinen O, Hakama M. Risk indicators for varicose veins in forty- to sixty-year-olds in the Tampere varicose vein study. *World J Surg.* 2002; 26:648-51.
- Laurindo F R M, Liberman M, Leite PL. Substâncias vasodilatadoras produzidas pelo endotélio. In Da Luz PL, Laurindo F R M, Chagas ACP. (eds). *Endotélio e doenças cardiovasculares.* São Paulo (SP): Atheneu; 2005. p. 33-42.
- Lebrin F, Mummery CL. Endoglin-mediated vascular remodeling: Mechanisms underlying hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc Med.* 2008; 18: 25-32.
- Lee KW, Lip GYH, Blann AD. Plasma Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Angiopoietin receptor Tie-2, and vascular endothelial growth factor levels in acute coronary syndromes. *Circulation.* 2004;110: 2355–2360.
- Leeuwenberg JFM, Smeets EF, Neeffjes JJ, Shaffer MA, Cinek T, Jeunhomme TM et al. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology.* 1992; 77: 543.
- Leu AJ, Leu HJ, Franzeck UK, Bollinger A. Microvascular changes in chronic venous insufficiency-A review. *Cardiovasc Surg.* 1995; 3(3):237-45.
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 350: 672–683.
- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 2006; 355: 992–1005.
- Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J.* 2000;14(1):55-64
- Lim CS, Davies AH. Pathogenesis of primary varicose veins. *Br J Surg.* 2009; 96:1231-1242.

Lindemayr W, Lofferer O, Mostbeck A, Partsch H. Arteriovenous shunts in primary varicosis? A critical essay. *Vasc Surg*. 1972; 6:9-13.

Lip GYH, Blann A. von Willebrand factor and its relevance to cardiovascular disorders. *Br Heart J*. 1995; 74:580-583.

Lip GYH, Blann A. von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? *Cardiovas Res*. 1997; 34:255–265.

Loskutoff DJ, Sawdey M, Mimuro J. Type 1 plasminogen activator inhibitor. *Prog Hemost Thromb*. 1989; 9:87-115.

Lu X, Chen Y, Huang Y, Li W, Jiang M. Venous hypertension induces increased platelet reactivity and accumulation in patients with chronic venous insufficiency. *Angiology*. 2006; 57:321-9.

Ludbrook J. The musculo-venous pumps of the human lower limb. *Am Heart J*. 1966; 71:635-41.

Lyons PD, Benveniste EN. Cleavage of membrane associated ICAM-1 from astrocytes: involvement of metalloprotease. *Glia* 1998; 22: 103.

Maffei FH, Magaldi C, Pinho SZ, Lastoria S, Pinho W, Yoshida WB et al. Varicose veins and chronic venous insufficiency in Brazil: prevalence among 1755 inhabitants of a country town. *Int J Epidemiol*. 1986; 15:210-7.

Matsuda M, Tsukada N, Miyagi K, Yanagisawa N. Increased levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in the cerebrospinal fluid and sera of patients with multiple sclerosis and human T lymphotropic virus type-1-associated myelopathy. *J Neuroimmunol*. 1995; 59:35-40.

Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics*. 2007; 62:77-86.

McGuckin M, Waterman R, Brooks J, Cherry G, Porten L, Hurley S et al. Validation of venous leg ulcer guidelines in the United States and United Kingdom. *Am J Surg*. 2002; 183:132-7.

McLafferty RB, Passman MA, Caprini JA, Rooke TW, Markwell SA, Lohr JM et al. Increasing awareness about venous disease: The American Venous Forum expands the National Venous Screening Program. *J Vasc Surg*. 2008; 48:394-9.

Meissner MH, Moneta G, Burnand K, Gloviczki P, Lohr JM, Lurie F et al. The hemodynamics and diagnosis of venous disease. *J Vasc Surg* 2007; 46:4S-24S.

Mendelsohn ME, Karas RH. Mechanisms of disease: the potential effects of estrogen on the cardiovascular system. *N England J Med*. 1999; 340:1801-11.

Mercuro G, Longu G, Zoncu S, Cherchi A. Impaired forearm blood flow and vasodilator reserve in healthy postmenopausal women. *Am Heart J*. 1999; 137:692-7.

Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J et al. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93, 11877–11882.

Michiels C, Bouaziz N, Remacle J. Role of the endothelium and blood stasis in the development of varicose veins. *Int Angiol*. 2002; 21:18-25.

Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*. 2003;196:430-43.

Montine TJ, Morrow JD. Fatty acid oxidation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2005; 166:1283–1289

Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ 2nd. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87:9383-7.

Moyses C, Cederholm-Williams SA, Michel CC. Haemoconcentration and accumulation of white cells in the feet during venous stasis. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1987; 5:311-20.

Musil D, Kaletova M, Herman J. Age, body mass index and severity of primary chronic venous disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011;155:367-71.

Nadar SK, Blann A, Beevers DG, Lip GYH. Abnormal angiopoietins 1&2, angiopoietin receptor Tie-2 and vascular endothelial growth factor levels in hypertension: relationship to target organ damage. *J Intern Med*. 2005;258:336–343.

Naoum JJ, Hunter GC, Woodside KJ, Chen C. Current advances in the pathogenesis of varicose veins. *J Surg Res*. 2007;141:311-6.

Nicolaidis AN. Investigation of chronic venous insufficiency: A consensus statement (France, March 5-9, 1997). *Circulation*. 2000;102: E126-63.

Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen receptor transcription and transactivation. Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res*. 2000;2:360-6.

Oklu R, Habito R, Mayr M, Deipolyi AR, Albadawi H, Hesketh R et al. Pathogenesis of varicose veins. *J Vasc Interv Radiol*. 2012; 23:33-9.

Ono T, Bergan JJ, Schmid-Schönbein GW, Takase S. Monocyte infiltration into venous valves. *J Vasc Surg*. 1998; 27:158-66.

Orfanos SE, Kotanidou A, Glynos C, Athanasiou C, Tsigkos S, Dimopoulou I et al. Papapetropoulos A and Roussos C. Angiopoietin-2 is increased in severe sepsis: correlation with inflammatory mediators. *Crit Care Med*. 2007; 35:199-206.

Palmer R M, Feirige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 92: 181-187.

Pappas PJ, Fallek SR, Garcia A, Araki CT, Back TL, Durán WN, Hobson RW 2nd. Role of leukocyte activation in patients with venous stasis ulcers. *J Surg Res.* 1995 Nov; 59:553-9.

Pappas PJ, You R, Rameshwar P, Gorti R, DeFouw DO, Phillips CK et al. Dermal tissue fibrosis in patients with chronic venous insufficiency is associated with increased transforming growth factor - β_1 gene expression and protein production. *J Vas Surg.* 1999; 30: 1129-1145.

Pappas PJ, Lal BK, Cerveira JJ, Padberg FT, Jr Duran WN. Causes of severe chronic venous insufficiency. *Semin Vasc Surg.* 2005; 18:30-5.

Parra JR, Cambria RA, Hower CD, Dassow MS, Freischlag JA, Seabrook GR et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is increased in the saphenofemoral junction of patients with varices in the leg. *J Vasc Surg.* 1998; 28:669-75.

Parikh SM, Mammoto T, Schultz A, Yuan HT, Christiani D, Karumanchi SA et al. Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *PLoS Med.* 2006; 3:e46.

Pascarella L, Schmid-Schönbein GW, Bergan JJ. Microcirculation and venous ulcer. *Ann Vasc Surg.* 2005; 19:921-927.

Patel KD, Moore KL, Nollert MU, McEver RP. Neutrophils use both shared and distinct mechanisms to adhere to selectins under static and flow conditions. *J Clin Invest* 1995; 96:1887–1896.

Pearson JD. Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 1999; 12:329-41.

Perrin M, Ramelet AA pharmacological treatment of primary chronic venous disease: rationale, results and unanswered questions. *Eur J Vasc Endovasc.* 2011; 41: 117-125.

Philips TJ, Dover JS. Leg Ulcers. *J Am Acad Dermatol.* 1991; 25:965-87.

Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, Gearing AJ. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;187:584-9.

Piulachs P, Vidal-Barraquer F. Pathogenic study of varicose veins. *Angiology.* 1953; 4:59-99.

Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 803-15.

Pratt GH. Arterial varices: A syndrome. *Am J Surg.* 1949;77:456-60.

Psaila JV and Melhuish J. Viscoelastic properties and collagen content of the long saphenous vein in normal and varicose veins. *Br J Surg.* 1989; 76:37-40.

Rabe E, Guex JJ, Puskas A, Scuderi A, Fernandez Quesada F. Epidemiology of chronic venous disorders in geographically diverse populations: results from the Vein Consult Program. *Int Angiol.* 2012; 31:105-15.

Raffetto JD. Dermal pathology, cellular biology and inflammation in chronic venous disease. *Thromb Res.* 2009; 123 S66-S71.

Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases in venous tissue remodeling and varicose vein formation. *Curr Vasc Pharmacol.* 2008a; 6:158-72.

Raffetto JD, Khalil RA. Mechanisms of varicose vein formation: valve dysfunction and wall dilation. *Phlebology.* 2008b; 23:85-98.

Raffetto JD, Qiao X, Koledova VV, Khalil RA. Prolonged increases in vein wall tension increase matrix metalloproteinases and decrease constriction in rat vena cava: Potential implications in varicose veins. *J Vasc Surg.* 2008; 48:447-56.

Rectenwald JE, Myers DD Jr, Hawley AE, Longo C, Henke PK, Guire KE et al. D-dimer, P-selectin, and microparticles: novel markers to predict deep venous thrombosis. A pilot study. *Thromb Haemost.* 2005; 94:1312-7.

Rieckmann P, Michel U, Albrecht M, Brück W, Wöckel L, Felgenhauer K. Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) block lymphocyte attachment to cerebral endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 1995; 60: 9.

Robertson L, Evans C, Fowkes FG. Epidemiology of chronic venous disease. *Phlebology.* 2008; 23:103-11.

Rothlein R, Mainolfi EA, Czajkowski M, Marlin SD. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol.* 1991; 147:3788-93.

Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; 22:S1-14.

Ruggeri ZM. Structure and function of von Willebrand factor. *Thromb Haemost.* 1999; 82:576-84.

Sadler JE. Thrombomodulin structure and function. *Thromb Haemost.* 1997; 78:392-5.

Saharay M, Shields DA, Porter JB, Scurr JH, Coleridge Smith PD. Leukocyte activity in the microcirculation of the leg in patients with chronic venous disease. *J Vasc Surg.* 1997; 26:265-73.

Saharay M, Shields DA, Georgiannos SN, Porter JB, Scurr JH, Coleridge Smith PD. Endothelial activation in patients with chronic venous disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1998; 15:342-9.

Salgado HC, Fazan Júnior R, Silva VJD. As veias e o retorno venoso. In: Aires MM (ed), *Fisiologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 441-447.

Sanada M, Higashi Y, Nakagawa K, Tsuda M, Kodama I, Kimura M et al. Comparison of low-dose and standard-dose oral estrogen on forearm endothelial function in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:1303-9.

Sándor T. Pathomechanism of chronic venous insufficiency and leg ulcer. *Acta Physiol Hung.* 2004; 91:131-45.

Sansilvestri-Morel P, Nonotte I, Fournet-Bourguignon MP, Rupin A, Fabiani JN, Verbeuren TJ et al. Abnormal deposition of extracellular matrix proteins by cultured smooth muscle cells from human varicose veins. *J Vasc Res.* 1998; 35:115-23.

Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Badier-Commander C, Kern P, Fabiani JN, Verbeuren TJ et al. Imbalance in the synthesis of collagen type I and collagen type III in smooth muscle cells derived from human varicose veins. *J Vasc Res.* 2001; 38:560-8.

Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Jaisson S, Fabiani JN, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM. Synthesis of collagen is dysregulated in cultured fibroblasts derived from skin of subjects with varicose veins as it is in venous smooth muscle cells. *Circulation.* 2002; 106:479-83.

Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Jullien ND, Lembrez N, Mestries-Dubois P, Fabiani JN et al. Decreased production of collagen Type III in cultured smooth muscle cells from varicose vein patients is due to a degradation by MMPs: possible implication of MMP-3. *J Vasc Res.* 2005; 42:388-98.

Sansilvestri-Morel P, Fioretti F, Rupin A, Senni K, Fabiani JN, Godeau et al. Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: does the skin reflect venous matrix changes? *Clin Sci (Lond).* 2007;112:229-39.

Sayer GL, Smith PD. Immunocytochemical characterisation of the inflammatory cell infiltrate of varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 28:479-83.

Schmid-Schönbein, GW. Molecular basis of venous insufficiency. In Bergan, JJ. (ed). *The vein book.* Amsterdam (The Netherlands): Elsevier Science Publishers B.V.; 2006. p. 67-78.

Schmid-Schönbein GW, Pascarella L. Inflammation and the pathophysiology of chronic venous disease: Molecular mechanisms. In Bergan, J.J. and Shortell, C.K. (eds). *Venous ulcers.* Amsterdam (The Netherlands): Elsevier Science Publishers B.V.; 2007.p.3-13.

Scott TE, LaMorte WW, Gorin DR, Menzoian JO. Risk factors for chronic venous insufficiency: a dual case-control study. *J Vasc Surg.* 1995; 22:622-8.

Shoab SS, Scurr JH, Coleridge-Smith PD. Increased plasma vascular endothelial growth factor among patients with chronic venous disease. *J Vasc Surg.* 1998;28:535-40.

Sidelmann JJ, Gram J, Jespersen J, Kluft C. Fibrin clot formation and lysis: basic mechanisms. *Semin Thromb Hemost.* 2000;26:605-18.

Siner JM, Bhandari V, Engle KM, Elias JA, Siegel MD. Elevated serum angiopoietin-2 levels are associated with increased mortality in sepsis. *Shock.* 2009; 31:348-53.

Somers P, Knaapen M. The histopathology of varicose vein disease. *Angiology*. 2006; 57:546-55.

Spertini O, Schleiffenbaum B, White-Owen C, Ruiz P, Jr Tedder TF. ELISA for quantitation of L-selectin shed from leukocytes in vivo. *J Immunol Methods*. 1992; 156:115-23.

Sporn LA, Marder VJ, Wagner DD. Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell* 1986; 46: 185–190.

Sporn LA, Marder VJ, Wagner DD. von Willebrand factor released from Weibel–Palade bodies binds more avidly to extracellular matrix than that secreted constitutively. *Blood*. 1987; 69, 1531–1534.

Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2009; 78:539-52.

Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood*. 1987; 69:381-7.

Stern DM, Esposito C, Gerlach H, Gerlach M, Ryan J, Handley D et al. Endothelium and regulation of coagulation. *Diabetes Care* 1991; 14:160-6.

Südhoff T, Wehmeier A, Kliche KO, Aul C, Schlömer P, Bauser U et al. Levels of circulating endothelial adhesion molecules (sE-selectin and sVCAM-1) in adult patients with acute leukemia. *Leukemia*. 1996;10:682-6.

Suzuki M, Grisham MB, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesive interactions: role of xanthine oxidase-derived oxidants. *J Leukoc Bio*. 1991; 50:488-94.

Szasz T, Thakali K, Fink GD, Watts SW. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007; 232:27-37.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Mattei P, Sudano I, Bernini G et al. Menopause is associated with endothelial dysfunction in women. *Hypertension*. 1996; 28:576-82.

ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 2008; 11:79-89.

Terpos E, Anargyrou K, Katodritou E, Kastritis E, Papatheodorou A, Christoulas D et al. Circulating angiopoietin-1 to angiopoietin-2 ratio is an independent prognostic factor for survival in newly diagnosed patients with multiple myeloma who received therapy with novel antimyeloma agents. *Int J Cancer*. 2012; 130(3):735-42.

The Criteria Committee of the New York Heart Association. Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels. 9th ed. Boston (Mass): Brown & Co; c1994. p. 253-256.

Thomas M, Augustin HG. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*. 2009;12:125-37.

Thomas PR, Nash GB, Dormandy JA. White cell accumulation in dependent legs of patients with venous hypertension: a possible mechanism for trophic changes in the skin. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1988a; 296:1693-5.

Thomas PR, Nash GB, Dormandy JA. White blood cells and venous ulceration. *Br Med J*. 1988b; 297:685.

Toporsian M, Gros R, Kabir MG, Vera S, Govindaraju K, Eidelman DH et al. A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res*. 2005; 96:684-92.

Tran NT, Meissner, MH. The epidemiology, pathophysiology and natural history of chronic venous disease. *Semin Vasc Surg*. 2002; 15: 5-12.

Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, Heidenreich R, Erber R, Wunder A et al. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J Clin Invest*. 2002; 109:777-85.

Vanhoutte PM. Endothelial control of vasomotor function – from health to coronary disease. *Circ J*. 2003; 67: 572 – 575.

van Meurs M, Kumpers P, Ligtenberg JJ, Meertens JH, Molema G, Zijlstra JG. Bench-to bedside review: Angiopoietin signalling in critical illness - a future target? *Crit Care* 2009;13:207.

van Mourik JA, Romani de Wit T, Voorberg J. Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem Cell Biol*. 2002;117:113-22.

Vassalli JD, Sappino AP, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest*. 1991; 88:1067-72.

Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 2006;12:642-9.

Virgini-Magalhães CE, Porto CL, Fernandes FFA, Dorigo DM, Bottino DA, Bouskela E. Use of microcirculatory parameters to evaluate chronic venous insufficiency. *J Vasc Surg*. 2006; 43:1037-44.

Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol*. 1990; 6:217.

Wakatsuki T, Kimura K, Kimura F, Shinomiya N, Ohtsubo M, Ishizawa M et al. A distinct mRNA encoding a soluble form of ICAM-1 molecule expressed in human tissues. *Cell Adhes Commun*. 1995; 3: 283.

Waksman Y, Mashiah A, Hod I, Rose SS, Friedman A. Collagen subtype pattern in normal and varicose saphenous veins in humans. *Isr J Med Sci*. 1997; 33:81-6.

White JV, Katz ML, Cisek P, Kreithen J. Venous outflow of the leg: anatomy and physiologic mechanism of the plantar venous plexus. *J Vasc Surg*. 1996; 24:819-24.

Whittaker N, Bunting S, Salmon J, Moncada S, Vane JR, Johnson RA et al. The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin). *Prostaglandins*. 1976; 12:915-928.

Witkowska AM, Borawska MH. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur Cytokine Netw*. 2004; 15:91-8.

Woodside KJ, Hu M, Burke A, Murakami M, Pounds LL, Killewich LA et al. Morphologic characteristics of varicose veins: possible role of metalloproteinases. *J Vasc Surg*. 2003; 38:162-9.

Word R. Medical and surgical therapy for advanced chronic venous insufficiency. *Surg Clin North Am*. 2010; 90:1195-214.

Wu Q, Zhao Z. Inhibition of PAI-1: a new anti-thrombotic approach. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2002; 2:27-42.

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000; 407: 242-248.

Yasim A, Kilinc M, Aral M, Oksuz H, Kabalci M, Eroglu E et al. Serum concentration of procoagulant, endothelial and oxidative stress markers in early primary varicose veins. *Phlebology*. 2008; 23:15-20.

Yin H, Gao L, Tai HH, Murphey LJ, Porter NA, Morrow JD. Urinary prostaglandin F2 alpha is generated from the isoprostane pathway and not the cyclooxygenase in humans. *J Biol Chem*. 2007; 282:329-36.

Yong K, Khwaja A. Leucocyte cellular adhesion molecules. *Blood Rev*. 1990; 4: 211-25.

APÊNDICE - Validação do método de ensaio

Procedimentos

Precisão

Para avaliação da precisão intra e inter-ensaio da maioria dos kits foram utilizados três CQs com faixas de concentração distintas (baixa, intermediária e alta). Nos kits para quantificação de P-selectina, L-selectina e sTM, que continham apenas um CQ, foi realizada uma diluição nesse CQ para se obter dois CQs com níveis de concentração diferentes. Para os kits de vWF e de *ent*-PGF_{2α}, que não possuíam controles, foram utilizadas diluições dos padrões de concentração para obter dois CQs com níveis de concentração diferentes.

Precisão intra-ensaio

Para avaliação da precisão intra-ensaio foram adicionados ao mesmo ensaio seis replicatas de cada um dos CQs. A partir do resultado dessas replicatas, foi calculado o coeficiente de variação (CV%) intra-ensaio para cada um dos CQs através da fórmula abaixo:

$$CV\% = 100 \times \frac{\text{Desvio-padrão entre replicatas}}{\text{Média da concentração das replicatas}} \quad (3)$$

Os CV% intra-ensaios obtidos eram comparados com os valores estabelecidos pelo fabricante. Se os valores estivessem em conformidade com aqueles propostos pelo fabricante, a precisão intra-ensaio era validada.

É importante ressaltar que quatro das seis replicatas de cada CQ deveriam estar dentro dos limites estabelecidos pelo fabricante. Caso contrário a precisão intra-ensaio era invalidada.

Precisão inter-ensaio

Para avaliação da precisão inter-ensaio foram adicionados em seis ensaios diferentes uma replicata de cada um dos CQs. A partir do resultado dessas replicatas, foi calculado o coeficiente de variação (CV%) inter-ensaio para cada um dos CQs através da fórmula abaixo:

$$CV\% = 100 \times \frac{\text{Desvio-padrão entre replicatas}}{\text{Média da concentração das replicatas}} \quad (4)$$

Os CV% inter-ensaios obtidos eram comparados com os valores declarados pelo fabricante. Se os valores estivessem em conformidade com aqueles propostos pelo fabricante, a precisão inter-ensaio era validada.

Além disso, quatro das seis replicatas de cada CQ deveriam estar dentro dos limites estabelecidos pelo fabricante. Caso contrário a precisão inter-ensaio era invalidada.

Linearidade

A análise da linearidade consistiu em fazer diluições 1:2 e 1:4 a partir da diluição original (indicada pelo fabricante do kit) de amostras de sangue e urina de voluntárias saudáveis (não participantes do estudo) para verificar se o valor de concentração mensurado com as duas diferentes diluições estava próximo ao valor teórico que é valor de concentração da amostra com a diluição original. Por biomarcador, foram utilizadas duas amostras de voluntárias saudáveis e para cada diluição, as amostras eram analisadas em duplicata. O cálculo da linearidade foi realizado conforme quadro abaixo (Quadro 4):

Quadro 4 – Cálculo da linearidade do kit

Fator de diluição	Valor mensurado	Valor teórico	Recuperação (%)
1	Z	-	-
2	xx	Z/2	Xx
4	xx	Z/4	Xx

Fonte: A autora, 2013.

A recuperação foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Valor mensurado} \times 100}{\text{Valor esperado}} \quad (5)$$

Verificação dos valores normais esperados

Os valores normais esperados para cada biomarcador foram verificados utilizando amostras de sangue coletadas de 20 mulheres adultas aparentemente saudáveis com faixa etária entre 20 e 40 anos. Os valores obtidos foram comparados com aqueles dos fabricantes.

Resultados

Para todos os biomarcadores, a precisão intra e inter-ensaio e linearidade estavam em conformidade com o estabelecido pelos fabricantes dos kits. Os valores normais esperados para sVCAM-1, MMP-2, MMP-3, TIMP-1, PAI-1, tPA, sTM e Endoglina ficaram dentro da faixa de normalidade informada pelo fabricante. A faixa de valores normais dos demais biomarcadores (com exceção de *ent*-PGF2 α cujos valores não foram informados pelo fabricante e IL-6 por não termos mais amostras de soro das voluntárias) diferiu em relação aos valores propostos pelo fabricante. O motivo dessa diferença pode ser decorrente do gênero e

da faixa etária das voluntárias. No processo de verificação de valores normais esperados realizados em nosso laboratório, todas as voluntárias eram mulheres com faixa etária entre 20-40 anos. Por outro lado, para obtenção das faixas de valores normais, os fabricantes provavelmente levaram em conta amostras de ambos os gêneros com outras faixas etárias.

Com base nos resultados da validação, o limite de quantificação de cada biomarcador, o ajuste da curva de calibração para análise de Ang-1 e o fator de diluição para o ensaios de sP-selectina, Ang-1 e vWF tiveram que ser alterados. Segue abaixo o quadro (Quadro 5) que resume os resultados obtidos com o processo de validação dos kits.

Quadro 5 – Resumo dos resultados do processo de validação dos kits (Continua)

Biomarcador Método Analítico, Kit	Fator de diluição	Precisão intra- ensaio (%)	Precisão inter- ensaio (%)	Linearidade (%)	Limite de quantificação	Valores normais esperados	Ajuste da curva padrão
sE-selectin/ ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	10	4,15	7,59	96-104	0,0476 (ng/ml)*	14-45 (ng/ml)	4-PL
sP-selectin /ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	2*	4,98	4,68	98-108	0,0954 (ng/ml)*	7-47 (ng/ml) **	4-PL
sL-selectin /ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	100	4,27	3,44	96-98	0,0309 (ng/ml)*	649-1.340 (ng/ml) **	4-PL
sICAM-1 /ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	20	4,20	4,46	88-95	0,0108 (ng/ml)*	159-256 (ng/ml) **	4-PL
sVCAM-1/ ELISA, Quantikine®(R& D Systems Inc)	20	6,99	2,10	106-116	0,0057 (ng/ml)*	330-776 (ng/ml)	Log-Log
MMP-2 /ELISA, Quantikine®(R& D Systems Inc)	10	3,53	4,56	91-104	0,0291 (ng/ml)*	137,89- 244,30 (ng/ml)	Log-Log
MMP-3 /ELISA, Quantikine®(R& D Systems Inc)	10	4,29	4,68	101-109	0,0129 (ng/ml)*	5,1-13,3 (ng/ml)	Log-Log

Quadro 5 – Resumo dos resultados do processo de validação dos kits (Continuação)

MMP-9 /ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	100	7,65	5,43	92-104	0,0204 (ng/ml)*	29,4-121,3 (ng/ml) **	4-PL
TIMP-1 /ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	100	1,96	3,65	98-100	0,0063 (ng/ml)*	131-202 (ng/ml)	4-PL
vWF /ELISA, Imubind® (American Diagnostica Inc)	200*	7,70	5,46	108-115	0,1188 (mUI/ml)*	465-1.838 (mUI/ml) **	4-PL
PAI-1/ Ensaio Cromogênico, Spectrolyse® (American Diagnostica Inc)	1	5,30	4,60	86-99	0,1 (UI/ml)*	3,33-20,92 (UI/ml)	Linear
tPA /ELISA, Imubind® (American Diagnostica Inc)	1	4,28	6,62	93-104	0,0450 (UI/ml)*	3,66-12,60 (UI/ml)	Linear
sTM /ELISA, Imubind® (American Diagnostica Inc)	4	4,66	7,81	104-114	0,0252 (ng/ml)*	3,29-4,75 (ng/ml)	4-PL
VEGF /ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	1	9,83	5,11	87-102	0,0292 (pg/ml)*	1,7-62,3 (pg/ml) **	4-PL
IL-6 /ELISA, High Sensitivity Quantikine® (R&D Systems Inc)	1	11,7	9,18	103-112	1,7700 (pg/ml)*	Não foi realizado	Log-Log
Ang-1/ ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	10*	3,60	3,80	97-105	0,3270 (pg/ml)*	1.267,3 - 6.048,2 (pg/ml) **	Log-Log*
Ang-2 /ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc)	5	2,96	4,01	100-103	0,0780 (pg/ml)*	952-3.565 (pg/ml) **	4-PL
sTie-2 /ELISA, Quantikine® (R&D Systems Inc.)	10	8,31	9,70	102-113	0,0369 (ng/ml)*	19,4-29,5 (ng/ml) **	Log-Log

Quadro 5 – Resumo dos resultados do processo de validação dos kits (Conclusão)

sEndoglin/ ELISA, Quantikine® (R& D Systems Inc)	1	2,14	3,22	93-101	0,0176 (ng/ml)*	3,68-6,43 (ng/ml)	4-PL
<i>ent</i> -PGF _{2α} / ELISA, Cayman Chemicals	10	11,12	15,73	89-104	0,0764 (pg/ml)*	809-9.638 (pg/ml) ***	4-PL

Nota: *Alterado em relação ao proposto pelo fabricante, ** faixas de valores normais diferentes das estabelecidas pelo fabricante e *** faixa de valores normais não fornecidas pelo fabricante pelo fabricante.

Fonte: A autora, 2013.